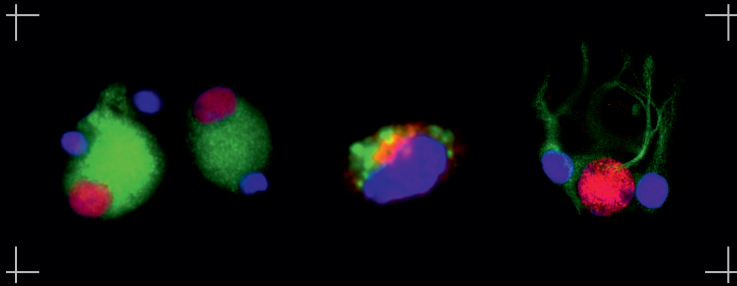


Stephan Leisengang

Effekte somatosensorischer, inflammatorischer
und pharmakologischer Stimuli auf
Primärzellkulturen von Strukturen des
thermoafferenten und nozizeptiven
Systems der Ratte



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet. beim Fachbereich
Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2019

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2019

© 2019 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und –Biochemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Roth

**Effekte somatosensorischer, inflammatorischer und
pharmakologischer Stimuli
auf Primärzellkulturen von Strukturen des
thermoafferenten und nozizeptiven Systems der Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Stephan Leisengang

Tierarzt aus Neuss

Gießen 2019

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Joachim Roth

zweiter Gutachter: Prof. Dr. Martin Schmidt

Tag der Disputation: 02.07.2019

*“It’s a dangerous business going out your door.
You step onto the road, and if you don’t keep your feet, there’s no knowing,
where you might be swept off to.”*

J.R.R. Tolkien, *The Lord of the Rings – The Fellowship of the Ring*, 1954

Abkürzungsverzeichnis:

ANOVA	Analysis of variance
ATP	Adenosintriphosphat
B1 / B2	Bradykinin Rezeptor 1 bzw. 2
BAT	Braunes Fettgewebe
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
Ca ⁺⁺ / Ca ²⁺	Calcium
Ca _v	Spannungsabhängiger Calcium-Kanal
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCL	CC Chemokin Ligand
CD-14	Cluster of differentiation 14
Cdk5	Cyclin-dependent kinase 5
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CHO	Chinese Hamster Ovary
CIS	Cisplatin
Cl ⁻	Chlorid
CMR	Cold- and menthol-sensitive receptor
COX	Zyklooxygenase
CVLM	Caudale ventrolaterale Medulla
CVO	Circumventrikuläres Organ
CXCL	CXC Motiv Chemokin Ligand
DAG	Diacylglycerol
DAMP	Damage associated molecular pattern
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol Dilaktat
DH	Dorsalhorn des Rückenmarks
DHA	Dorsale hypothalamische Region
DMH	Dorsomedialer Hypothalamus
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Deoxynucleosidetriphosphat
DRG	Spinalganglion (<i>Dorsal root ganglion</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EP	Prostaglandin E ₂ Rezeptor
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
GABA	γ -Aminobuttersäure
GBSS	Gey's Balanced Salt Solution
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
Glut	Glutamat
gp130	Glykoprotein 130
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
I κ B	Inhibitor of kappa B
IKK	Inhibitor of kappa B Kinase
IL	Interleukin
IP	Prostaglandin I ₂ Rezeptor
IP3	Inositol-Triphosphat
JAK	Janus activated kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
K ⁺	Kalium
LBP	Lipopolysaccharid bindendes Protein
LPB	<i>Nucleus parabrachialis lateralis</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAP2	Microtubule associated protein 2
MAPK	Mitogen activated protein kinase
Mg ²⁺	Magnesium
MnPO	<i>Nucleus medianus praeopticus</i>
MPA	Mediales präoptisches Areal

mPGES	Mikrosomale Prostaglandin E Synthase
mRNA	Messenger RNA
Na ⁺	Natrium
Na _v	Spannungsabhängiger Natrium-Kanal
NBA	Neurobasal A
NFκB	Nuclear Factor kappa B
NF-IL6	Nuclear Factor Interleukin 6
NGF	Nerve growth factor
NSAID	Nonsteroidal anti-inflammatory drug
NTS	<i>Nucleus tractus solitarii</i>
OVLТ	<i>Organum vasculosum laminae terminalis</i>
P2Y	Purinozeptor
PAG	Periaqueductal grey matter (= <i>Substantia grisea periaqueductalis</i>)
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBMC	1-Phenylethyl-4-(Benzylloxy)-3-Methoxybenzyl(2-Aminoethyl)-Carbamat
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PNS	Peripheres Nervensystem
POA	Präoptische Region

POAH	Präoptische / anteriore hypothalamische Region
PoT	Posteriorer Anteil des <i>Nucleus triangularis</i>
PTK	Protein Tyrosin Kinase
Raf	Rat fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
RPa	<i>Nucleus raphe pallidus</i>
RVM	Rostrale ventromediale Medulla
SEM	Standard error of the mean
SFO	Subformikalorgan
SG	<i>Substantia gelatinosa</i>
SNS	Sensory neuron specific sodium channel
SOCS	Supressor of cytokine signaling
SP	Substanz P
SPN	Sympathisches präganglionäres Neuron
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor Rezeptor
trkA	Tropomyosin Rezeptor Kinase A
TRP	Transient receptor potential
TRPA	Transient receptor potential ankyrin
TRPM	Transient receptor potential melastatin
TRPV	Transient receptor potential vanilloid
TTX	Tetrodotoxin
VH	Ventralhorn
VR	Vanilloid Rezeptor
ZNS	Zentrales Nervensystem

INHALT

A. Einleitung	1
B. Literaturübersicht	4
1. Das afferente somatosensorische System.....	4
1.1. Rolle von TRP-Kanälen für das Temperatur- & Schmerzempfinden	6
1.1.1. TRPV1.....	9
1.1.2. TRPM8	12
1.2. Spinalganglien	14
1.3. Weitere afferente Verschaltung im ZNS	17
1.3.1. Weitere Verschaltung von Temperaturreizen	18
1.3.2. Weitere Verschaltung von Schmerzreizen	19
1.4. Der <i>Nucleus preopticus medianus</i> als zentrale Schaltstelle der Thermoregulation	20
1.5. Die efferente Verschaltung in der Thermoregulation	25
1.6. Beteiligung des MnPO an der Schmerzverarbeitung	25
2. Veränderungen der Wahrnehmung thermischer und noxischer Reize im Rahmen von Entzündungen	26
2.1. Bildung neuroaktiver Substanzen nach Verletzung und Entzündung	26
2.2. Sensibilisierung von Nerven durch neuroaktive Substanzen	30
2.2.1. Transkriptionale Modulation durch die Zytokine IL-6 und TNF α	32
2.2.2. Posttranslationale Modulation des TRPV1	36
2.2.3. Posttranslationale Modulation des TRPM8.....	40
2.2.4. Posttranslationale Modulation spannungsabhängiger Natrium- und Calcium-Kanäle.....	41
2.3. Von akutem zu neuropathischem Schmerz	43
2.4. Therapieansätze zur Behandlung von inflammatorischem und neuropathischem Schmerz.....	45

3. Zellkultur als Alternative zum Tierversuch	48
C. Eigene Untersuchungen	50
1st Publication: Primary cultures from rat dorsal root ganglia: Responses of neurons and glial cells to somatosensory and inflammatory stimulation.....	50
2nd Publication: Effects of thermal stimulation on neurons and astrocytes cultured from the rat median preoptic nucleus	85
3rd Publication: Effects of gabapentinoids on responses of primary cultures of rat dorsal root ganglia to inflammatory or somatosensory stimulation	99
D. Erweiterte Diskussion	117
1. Einfluss thermischer und chemischer Stimuli auf Primärzellkulturen von Spinalganglien (DRG).....	118
2. Einfluss inflammatorischer Stimulation der DRG Zellkultur auf die Sensibilisierung von Neuronen und Produktion inflammatorischer Mediatoren	120
3. Besondere Rolle der peripheren Gliazellen und Makrophagen für die inflammatorische Antwort.....	124
4. Effekte von Gabapentinoiden auf die somatosensorische und inflammatorische Stimulation von Primärzellkulturen der Spinalganglien	126
5. Einfluss thermischer Stimulation auf Zellen von Primärzellkulturen des <i>Nucleus preopticus medianus</i> (MnPO)	130
6. Neurogliale Primärzellkulturen zur Untersuchung der sensorischen Wahrnehmung - Vorteile und Limitationen	134
7. Perspektiven für weiterführende Untersuchungen	136
E. Zusammenfassung	138
F. Summary	141
G. Literatur	144
H. Anhang.....	171
1. Publikationsliste	171
1.1. Originalarbeiten in Fachzeitschriften (<i>peer review</i>).....	171

1.2.	Zitierbare Kurzmitteilungen	171
1.3.	Beiträge bei wissenschaftlichen Konferenzen.....	172
2.	Danksagung.....	173
3.	Erklärung zur Dissertation	175

A. EINLEITUNG

Die Detektion von Reizen aus der Umwelt ist für die Aufrechterhaltung der körpereigenen Homöostase und den Schutz vor schädlichen Einflüssen unerlässlich. Zu diesen externen Reizen zählen unter anderem thermische, mechanische und chemische Stimuli, welche auch als schmerzhaft wahrgenommen können. Für die Wahrnehmung dieser sind vor allem Kanäle aus der TRP-Familie (*transient receptor potential*) von Bedeutung, die von primären afferenten Neuronen sowohl in deren peripheren freien Nervenendigungen, wie auch in den Zellkörpern in den Spinalganglien und den zentralen Endigungen im Dorsalhorn des Rückenmarks exprimiert werden. Dort findet eine synaptische Übertragung auf sekundäre afferente Neurone statt, welche Informationen über aufsteigende Bahnen in das Gehirn leiten, wo dann unterschiedliche Verschaltungen zur bewussten Wahrnehmung der Reize oder zu unbewussten Regulationsmechanismen führen. Für die Regulation des Temperaturhaushaltes spielt die Region des *Nucleus preopticus medianus* (MnPO) im Hypothalamus eine entscheidende Rolle. Hier werden eingehende Reize auf Neurone übertragen, die zum efferenten thermoregulatorischen System zählen. Diese sind in der Lage, bestimmte thermoregulatorische Mechanismen wie zum Beispiel Muskelzittern, Aktivierung des braunen Fettgewebes, Schwitzen und Beeinflussung des Gefäßdurchmessers in Gang zu setzen. Dadurch kann die Körpertemperatur auf einem konstanten Level gehalten werden. Hierbei spielen nicht nur thermische Informationen aus der Peripherie eine Rolle, sondern auch aus dem Bereich des zentralen Nervensystems, wie dem Rückenmark und dem Hypothalamus selbst. Detaillierte Erläuterungen zur Detektion und Verschaltung thermischer und noxischer Reize sind in der Literaturübersicht im Abschnitt 1 zusammengestellt.

Im Rahmen von Entzündungen und Verletzungen kann es zu einer veränderten Wahrnehmung von Reizen kommen. Dabei werden nicht schmerzhaft stimuli als schmerzhaft wahrgenommen (Allodynie) oder es kommt zur Verstärkung schmerzhafter Reize (Hyperalgesie). Hierbei sind verschiedene inflammatorische Mediatoren, wie z.B. Zytokine und Prostaglandine, von Bedeutung. Sie sind in der Lage, Schmerz- oder Thermo-Rezeptoren entweder selbst zu stimulieren oder über G-Protein gekoppelte Rezeptoren intrazelluläre Signalwege zu aktivieren, die über transkriptionale, translationale oder posttranslationale Mechanismen zu einer Verstärkung der

Reizwahrnehmung führen. Diese Sensibilisierung hat pathophysiologisch eine Schutz- bzw. Schonfunktion. Der geschädigte Bereich soll dabei besonders sensibel auf Reize aus der Umwelt reagieren. Mit dem Abklingen der Entzündung bzw. Ausheilen der Verletzung geht auch die Überempfindlichkeit auf bestimmte Reize in der betroffenen Region zurück. Es kann jedoch insbesondere bei Verletzungen peripherer Nerven, aber auch durch verschiedene metabolische, toxische, infektiöse oder Medikamenten-induzierte Ursachen zum Persistieren des Schmerzes kommen, wodurch dieser vom Krankheitssymptom selbst zur Erkrankung wird. Dieser chronisch persistierende Schmerz wird als neuropathischer Schmerz bezeichnet, wobei nach wie vor diskutiert wird, welche Faktoren dazu führen, dass der Schmerz fortbesteht. Insgesamt besteht großes Interesse daran, die Mechanismen der Sensibilisierung peripherer Nerven und die Rolle beteiligter inflammatorischer Mediatoren detaillierter aufzudecken, auch um neue Therapieansätze für Schmerzmittel zu finden. Auf welchen Wegen periphere Neurone sensibilisiert werden können, welche Mediatoren und Signalwege dabei eine Rolle spielen und welche therapeutischen Ansatzpunkte sich dabei ergeben, ist im Abschnitt 2 der Literaturübersicht zusammengefasst.

Die zentralen Fragestellungen und Ziele der vorliegenden Arbeit lassen sich wie folgt umreißen:

- Zeigen Neurone in Primärzellkulturen von Spinalganglien der Ratte Zellantworten auf thermische und chemische Stimulationen?
- Wie verändern sich die Zellantworten von Neuronen der Spinalganglien im Zuge einer simulierten Entzündung mittels Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation?
- Lassen sich nach LPS-Stimulation Veränderungen in der Genexpression bedeutender inflammatorischer Mediatoren sowie in der Freisetzung der Zytokine Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) und Interleukin 6 (IL-6) in die Überstände der Zellkulturen feststellen? Welche Zelltypen sind an deren Bildung beteiligt?
- Lässt sich eine nukleäre Translokation von für die Neuroinflammation bedeutenden Transkriptionsfaktoren beobachten und welche Zelltypen sind hiervon betroffen?

- Welchen Einfluss hat eine pharmakologisch induzierte Reduktion von Makrophagen und Satellitenglia-Zellen auf die Primärzellkultur von Spinalganglien und deren Reaktion auf inflammatorische Stimulation?
- Wie verändern sich Zellantworten einzelner Neurone sowie die Antwort auf inflammatorische Stimulation der Zellkultur im Gesamten nach Zugabe der in der Schmerztherapie eingesetzten Gabapentinoide Gabapentin und Pregabalin?
- Lassen sich kalt- und warm-sensitive Neurone in Primärzellkulturen des MnPO, als zentraler Schaltstelle der Thermoregulation, auffinden?

B. LITERATURÜBERSICHT

1. Das afferente somatosensorische System

Die Wahrnehmung von Reizen aus der Umwelt, wie thermischen, mechanischen, chemischen und noxischen Stimuli, ist für den menschlichen und tierischen Organismus von zentraler Bedeutung. Einerseits dient sie zum Schutz vor möglichen schadhaften Umwelteinflüssen, auf der anderen Seite können Informationen genutzt werden, um die körpereigene Homöostase aufrecht zu erhalten. Hierzu zählen neben der Thermoregulation zum Beispiel auch die Regulation des Blutdrucks, die Osmoregulation oder die Atmungsregulation. Um Veränderungen regulieren zu können, ist die Wahrnehmung von Reizen und deren anschließende Weiterleitung zu den zentralen Regulationszentren unerlässlich (Behrends et al. 2017). Im Folgenden soll sich hier auf das Temperatur- & Schmerzempfinden beschränkt werden. Thermische und noxische Reize werden durch freie Nervenendigungen in der Haut, aber auch in inneren Organen wahrgenommen. Hierbei spielen vor allem Kanäle der *transient receptor potential* (TRP)-Familie eine wichtige Rolle (Clapham 2003). Diese detektieren Veränderungen der Temperatur bzw. schmerzhafte Stimuli, wie Hitze, bestimmte chemische Substanzen oder pH-Veränderungen und leiten die Information über afferente Fasern (A δ - und C-Typ) zunächst in die Dorsalhörner des Rückenmarks (Laminae I & II, *Substantia gelatinosa*). Hier findet eine Verschaltung von diesen primären afferenten Neuronen, entweder direkt oder indirekt über Interneurone, auf sekundäre Projektionsneurone statt (Todd 2010). Über aufsteigende Bahnen werden Informationen in verschiedene Regionen des Gehirns weitergegeben. Für die bewusste Wahrnehmung von Temperatur und Schmerz projizieren Neurone über den Thalamus vor allem in den somatosensorischen Kortex (Craig et al. 1994). Für die unbewusste Regulation der Körpertemperatur verläuft der Signalweg über den *lateralen parabrachialen Nucleus* (LPB) vor allem zum *Nucleus preopticus medianus* (MnPO), der als zentrale Schaltstelle für die Thermoregulation gilt (Morrison und Nakamura 2011). Auch die Verarbeitung von Schmerzreizen enthält unbewusste Komponenten, die zur Aktivierung des sympathischen Nervensystems und einer Reihe von vegetativen Reflexen führen. Auch hierbei sind afferente Projektionen

über den LPB zum MnPO beteiligt (Gauriau und Bernard 2002; Ossipov et al. 2010; Baumgärtner 2010).

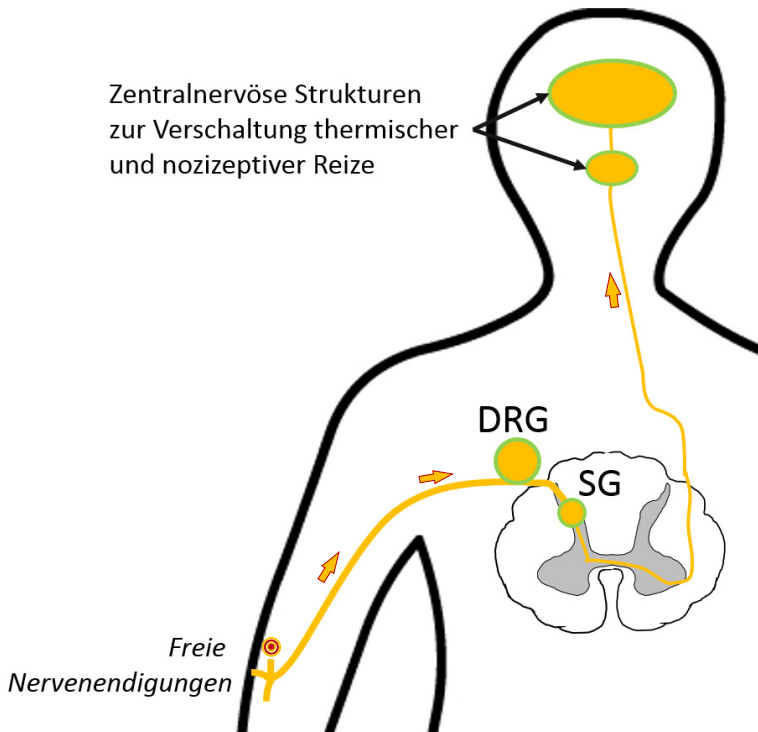


Abbildung 1:

Vereinfachte Darstellung des afferenten somatosensorischen Systems
(eigene Abbildung)

Thermische und nozizeptive Reize (☉) werden z.B. in der Haut durch Rezeptoren in freien Nervenendigungen detektiert und axonal über die Spinalganglien (DRG) in das Dorsalhorn des Rückenmarks (*Substantia gelatinosa*, SG) geleitet, von wo aus sie über aufsteigende Bahnen in die jeweiligen Zielregionen im Gehirn weitergegeben werden.

1.1. Rolle von TRP-Kanälen für das Temperatur- & Schmerzempfinden

An der Wahrnehmung von Temperatur- und Schmerzreizen sind die sogenannten *transient receptor potential* (TRP)-Kanäle maßgeblich beteiligt. TRP-Kanäle sind Tetramere mit je 6 transmembranösen Polypeptid-Untereinheiten (S1-S6), wobei die jeweilige S5- und S6-Untereinheit die Pore für durchströmende Kationen bilden. Die meisten TRP-Kanäle sind relativ unselektiv für Kationen und lassen bei adäquater Aktivierung sowohl Calcium, als auch Natrium in die Zelle einströmen, was zur anschließenden Depolarisation der Zelle führt (Clapham 2003; Tominaga und Tominaga 2005). Die gesamte Familie der TRP-Kanäle umfasst 7 Unterfamilien mit vielfältigen sensorischen Aufgaben (Clapham 2003; Emir 2017). Als Temperatur-responsiv gelten aus der TRPV(*vanilloid*)-Unterfamilie der TRPV1, TRPV2, TRPV3 und TRPV4, aus der TRPM(*melastatin*)-Unterfamilie der TRPM2, TRPM3, TRPM4 und TRPM8, sowie der TRPA(*ankyrin*)-1 (Wang und Siemens 2015; Dhaka et al. 2006; Patapoutian et al. 2003). Nicht für jeden dieser Temperatur-sensitiven Kanäle konnte auch eine physiologische thermoregulatorische Funktion nachgewiesen werden. Abbildung 2 zeigt einige Beispiele von Thermo-TRP's mit dem jeweiligen Temperaturbereich, in dem sie aktiviert werden, sowie die Agonisten des TRPM8 und des TRPV1 Menthol und Capsaicin.

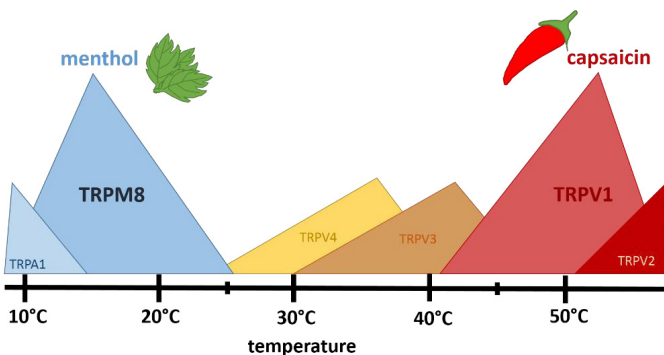


Abbildung 2:

Temperatur-sensitive TRP-Kanäle und ihr Aktivitätsbereich sowie die Agonisten des TRPM8 (Menthol) und des TRPV1 (Capsaicin).
(eigene Abbildung, modifiziert nach Dhaka et al. 2006)

Wie genau der Mechanismus der Temperatur-Sensitivität der Kanäle funktioniert, ist nach wie vor nicht gänzlich geklärt. Es werden drei mögliche Mechanismen angenommen. Zunächst könnte durch eine Veränderung der Temperatur ein bestimmter Ligand oder *second messenger* des Kanals produziert werden, welcher dann den entsprechenden TRP-Kanal öffnet. Eine zweite Möglichkeit könnte eine direkte Strukturveränderung des TRP-Kanals durch einen bestimmten Temperaturbereich darstellen. Im Rahmen einer dritten Hypothese wird angenommen, dass es zu einer temperaturabhängigen Umstrukturierung der Membran kommt, welche in Veränderungen der Membranspannung resultiert, was wiederum von dem entsprechenden TRP-Kanal detektiert werden kann (Clapham 2003; Voets et al. 2004). Die Aktivierung durch einen bestimmten Temperaturbereich scheint dabei anders zu funktionieren als durch einen Agonisten, wie Capsaicin für den TRPV1 oder Menthol und Icilin für den TRPM8 (Abbildung 2). Die Temperatur-Sensitivität hängt stark von dem C-Terminus des TRP-Kanals ab, während die Capsaicin- und Icilin-Aktivität auf die intrazelluläre Schleife zwischen der zweiten und dritten transmembranösen Einheit zurückzuführen ist (Brauchi et al. 2006; Jordt und Julius 2002; Chuang et al. 2004).

Auch für verschiedene noxische Reize sind TRP-Kanäle von großer Bedeutung, wobei zwischen thermischen, chemischen und mechanischen Stimuli unterschieden werden kann. Im Bereich noxischer Hitze spielt vor allem der TRPV1 eine Rolle, auf den im nächsten Abschnitt detaillierter eingegangen wird. Neben diesem wird eine Funktion der Kanäle TRPV2, TRPV3 und TRPV4, sowie des TRPM3 für das Empfinden noxischer Hitze diskutiert (Laing und Dhaka 2016; Patapoutian et al. 2009; Vriens et al. 2011). Im Bereich extremer Kälte ist vor allem der TRPA1 aktiv, aber auch in TRPM8 knockout Mäusen wurde eine Beeinträchtigung des Empfindens noxischer Kälte gezeigt (Laing und Dhaka 2016; Patapoutian et al. 2009; Dubin und Patapoutian 2010), was auch hier auf eine Beteiligung dieses Kanals hinweist. Neben der Detektion von thermischen Reizen spielen TRP-Kanäle auch bei noxischen Stimuli chemischer und mechanischer Art eine Rolle. So kann der TRPV1 durch pH-Wert-Veränderungen, sowohl in den basischen, als auch in den sauren Bereich, aktiviert werden (Dhaka et al. 2009). Eine Aktivierung durch mechanische Reize wurde für den TRPV2 und TRPV4 beschrieben (Basbaum et al. 2009; Muraki et al. 2003).

Der Schwerpunkt dieser Dissertation liegt auf den Kanälen TRPV1 und TRPM8 und deren Aktivierung durch thermische und chemische Stimuli, sowie deren Modulation im Rahmen von Entzündungen (siehe Abschnitt 2).

In einer Teilstudie wurde jedoch auch der erst kürzlich charakterisierte physiologische Wärmesensor, der TRPM2 Kanal (Song et al. 2016), unter Verwendung einer Primärkultur des MnPO, experimentell untersucht. Dieser Gehirnregion wird traditionell die Schlüsselrolle bei der zentralnervösen Warm-Sensitivität zugeschrieben (McKinley et al. 2015).

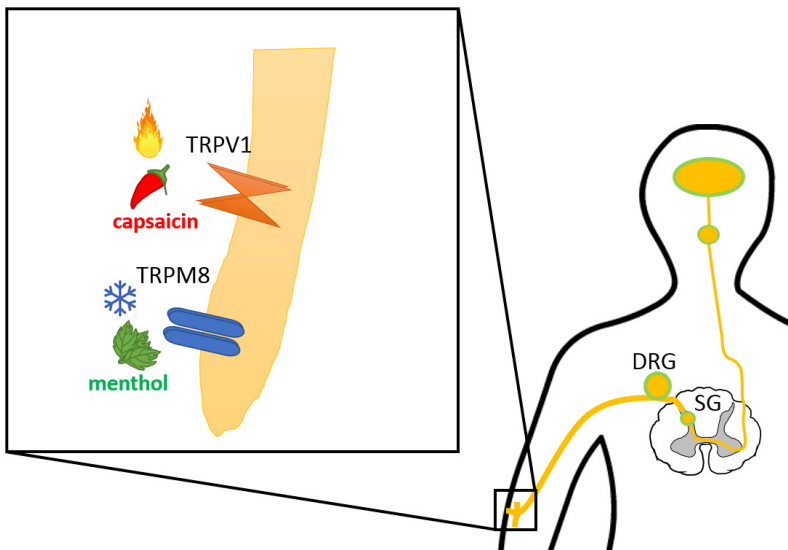


Abbildung 3:

Der Hitze-sensitive TRPV1 mit Capsaicin als Agonisten und der Kälte-sensitive TRPM8 mit dem Agonisten Menthol in freien Nervenendigungen im Kontext zum afferenten somatosensorischen System (siehe Abbildung 1) (eigene Abbildung)

1.1.1. TRPV1

Der TRPV1 ist der am längsten bekannte und wohl am intensivsten untersuchte TRP-Kanal. Dass durch den zB. in Chilischoten vorhandenen Inhaltsstoff Capsaicin das Empfinden von Hitze und brennendem Schmerz vermittelt wird, ist bereits lange bekannt. Der hierfür verantwortliche TRP-Kanal, TRPV1, ursprünglich als VR1 (*vanilloid receptor 1*) bezeichnet, wurde dagegen erst in den 1990er Jahren entdeckt. Der TRPV1 Agonist Capsaicin wurde bereits Mitte des 19. Jahrhunderts zum ersten Mal isoliert. Im Jahre 1919 wurde dessen chemische Struktur aufgedeckt und 1930 gelang zum ersten Mal die chemische Synthese der Substanz (aus: Szallasi und Blumberg 1999). Von da an begann die Suche nach einem möglichen Rezeptor für Capsaicin und dem dahinter stehenden Biomechanismus. Während eine ganze Reihe neuropharmakologischer Effekte von Capsaicin bereits untersucht und beschrieben wurden (für einen Überblick siehe: Buck und Burks 1986), verfestigte sich 1987 in *in vitro* Studien von Marsh et al. (Marsh et al. 1987) die Annahme, dass es durch Capsaicin zu einer erhöhten Permeabilität für Calcium, Natrium, sowie auch Kalium in der Membran von bestimmten Neuronen der Spinalganglien kommt. Szallasi et al. erbrachten 1990 den ersten direkten Nachweis, dass es für die Gruppe der Vanilloide (u.a. Capsaicin) spezifische Rezeptoren, die so genannten Vanilloid-Rezeptoren, geben muss (Szallasi und Blumberg 1990a, 1990b). 1997 gelang es der Arbeitsgruppe um Michael Caterina zum ersten Mal, die cDNA für den VR1 Rezeptor aus Neuronen von Spinalganglien zu klonieren und in HEK293 Zellen zu transfizieren (Caterina et al. 1997). Sie stellten auch erstmals die Homologie des Rezeptors zu Mitgliedern der TRP-Familie dar. Heute ist bekannt, dass der TRPV1 durch diverse noxische Stimuli aktiviert werden kann. Neben dem Agonisten Capsaicin, spielt vor allem auch die Aktivierung durch Hitze ($> 41\text{ }^{\circ}\text{C}$) eine große Rolle. Neurone, die auf Capsaicin mit einem Calcium-Einstrom reagieren, zeigen häufig eine ähnliche zelluläre Antwort auf einen Temperaturanstieg über $41\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Kirschstein et al. 1997; Nagy und Rang 1999) und auch TRPV1-transfizierte HEK293 Zellen zeigten diese Zellantworten (Caterina et al. 1997). Die Rolle des TRPV1 für die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur wird kontrovers diskutiert. Tiere verschiedener Spezies zeigten als Reaktion auf TRPV1 Antagonisten neben einem reduzierten Schmerzempfinden auch einen Anstieg der Körpertemperatur (Hyperthermie) (Gavva et al. 2007; Gavva 2008; Romanovsky et al. 2009). Durch Injektion von Capsaicin, als Agonisten, in den Bereich des Hypothalamus kam es dagegen zum Temperaturabfall (Jancsó-Gábor et al. 1970a). Auch eine subkutane oder intraperitoneale Injektion von Capsaicin führt zu einer

Hypothermie (Hori 1984; Jancsó-Gábor et al. 1970b). In TRPV1 knockout Mäusen (TRPV1^{-/-}) wurde in zahlreichen Studien die Rolle des TRPV1 in der Thermoregulation untersucht. Iida et al. zeigten, dass bei TRPV1^{-/-} Mäusen weder der zirkadiane Rhythmus der Körperkerntemperatur, noch die Toleranz gegenüber erhöhten (> 35 °C) oder erniedrigten (< 4 °C) Temperaturen beeinflusst waren (Iida et al. 2005). Auch eine durch Ethanol induzierte Hypothermie war unverändert. Ein Effekt konnte hingegen bei durch Lipopolysaccharid (LPS) induziertem Fieber gezeigt werden. So hatten TRPV1^{-/-} Mäuse einen geringeren Anstieg der Körpertemperatur, als Wildtyp-Mäuse (Iida et al. 2005). Auch Szélényi et al. konnten in Untersuchungen mit intraperitonealen biotelemetrischen Sendern nur geringe Unterschiede im zirkadianen Rhythmus und keine Unterschiede bezüglich der Hitze-Toleranz feststellen (Szélényi et al. 2004). Insgesamt scheinen Agonisten und Antagonisten des TRPV1 die Thermoregulation von Säugern in gewissem Umfang zu beeinflussen, eine Rolle dieses Kanals als physiologischer Warmsensor ist hingegen unwahrscheinlich (Romanovsky et al. 2009; Szolcsányi 2015).

Von größerer Bedeutung scheint die Funktion des TRPV1 als Schmerzsensor zu sein. Vor allem durch seine Lokalisation in der Peripherie, in freien Nervenendigungen in der Haut, ist der Organismus in der Lage, verschiedene noxische Stimuli zu detektieren. Neben Hitze (> 41 °C) und Capsaicin spielen auch weitere Substanzen, wie Resiniferatoxin, Anandamid oder *N*-Arachidonoyl-Dopamin eine Rolle als Agonisten (Tominaga und Tominaga 2005; Tominaga et al. 1998). Sie führen sowohl in *in vivo* Experimenten zu Schmerzverhalten, als auch *in vitro* in Neuronen der Spinalganglien zu direkten Zellantworten. In einer kombinierten *in vivo* / *in vitro* Versuchsreihe zeigten Caterina et al., dass bei TRPV1^{-/-} Mäusen die Zellantworten von kultivierten Neuronen aus Spinalganglien auf Capsaicin, Resiniferatoxin und eine pH-Absenkung auf pH 5, drastisch reduziert bzw. gänzlich ausgelöscht waren. In Verhaltensversuchen zeigten Mäuse ohne TRPV1 zudem ein reduziertes Schmerzverhalten nach Capsaicin-Injektion in die plantare Seite der Hintergliedmaße sowie auf thermische Reize über 41 °C (Caterina et al. 2000).

Aufgrund seiner entscheidenden Rolle beim Schmerzempfinden wurde der TRPV1 auch zum Ziel in der Entwicklung neuer analgetischer Medikamente in der Schmerztherapie. Zum einen lässt sich die Wahrnehmung von Schmerz durch direkte Antagonisten am TRPV1 blockieren, zum anderen kann eine Aktivierung durch einen Agonisten zu einer Desensibilisierung mit anschließender Schmerzlinderung führen (Patapoutian et al. 2009;

Maggi 1991). So kommt es nach lokaler Applikation von Capsaicin oder -Analoga initial zu einer kurzzeitigen Irritation, gefolgt von einer lang anhaltenden Insensitivität auf noxische Reize (Hayes et al. 1984), die über Wochen bis Monate anhalten kann (Chung und Campbell 2016). Allerdings zeigten Tiere in klinischen Studien bei systemischer Applikation immer wieder schwerwiegende Nebenwirkungen. Zum einen betreffen diese die oben beschriebenen Effekte auf das thermoregulatorische System (Jancsó-Gábor et al. 1970a; Jancsó-Gábor et al. 1970b), zum anderen hat Capsaicin auch einen toxischen Effekt auf primäre afferente Neurone (Maggi 1991; Patapoutian et al. 2009), was einen therapeutischen Einsatz bislang nur begrenzt zulässt. Dass aber die Modulation des TRPV1 ein interessantes Ziel in der Schmerztherapie darstellt, zeigen auch nach wie vor aktuelle klinische Studien mit TRPV1 Agonisten und Antagonisten (Patapoutian et al. 2009). Die beschriebene Desensibilisierung konnte auch auf zellulärer Ebene wiederholt festgestellt werden (Caterina et al. 1997; Piper et al. 1999; Koplas et al. 1997). Neben der Desensibilisierung mit verringertem Schmerzempfinden kann es auch zu einer Sensibilisierung des TRPV1, vor allem durch inflammatorische, aber auch andere Stimuli, mit gesteigertem Schmerzempfinden kommen, worauf in Abschnitt 2.1. näher eingegangen wird.

Neben der Rolle des TRPV1 als peripherer Schmerzsensor wird eine Funktion im zentralen Nervensystem (ZNS) kontrovers diskutiert. Die Beobachtung, dass eine Injektion von Capsaicin in den Bereich des Hypothalamus eine Hypothermie auslöst (Jancsó-Gábor et al. 1970a), führte diesbezüglich zu zahlreichen Untersuchungen. Dass der TRPV1 in verschiedenen Regionen des Gehirns exprimiert wird, wurde mit Hilfe von Autoradiographie (Roberts et al. 2004) und Immunhistochemie bei Maus (Cristino et al. 2006) und Ratte (Tóth et al. 2005) gezeigt, wobei die relative Expression in Spinalganglien etwa 28 mal höher ist als in allen untersuchten zentralnervösen Gebieten (Sanchez et al. 2001). Eine eindeutige Funktion des TRPV1 im ZNS konnte bislang nicht nachgewiesen werden, aber die Vermutungen sind je nach Hirnregion vielfältig. Im Bereich des Hypothalamus wurde eine erniedrigte Thermo-Sensitivität in Neuronen von TRPV1^{-/-} Mäusen festgestellt (Sharif-Naeini et al. 2008). Ein Einfluss auf die synaptische Übertragung und Modulierbarkeit sowohl glutamaterger, als auch GABAerger Signale wurde in vielen Studien gezeigt und kann je nach Region verschiedene Effekte haben (Kauer und Gibson 2009; Marzo et al. 2008). So wird neben einem Einfluss auf die Schmerzbahnen (Steenland et al. 2006) und das Thermoregulationssystem (Sharif-Naeini

et al. 2008) auch eine Beteiligung beim Lernverhalten (Gibson et al. 2008) sowie bei Epilepsie (Shirazi et al. 2014; Manna und Umathe 2012) angenommen. Die genaue Funktion des Kanals im zentralen Nervensystem ist jedoch noch nicht abschließend geklärt.

1.1.2. TRPM8

Der TRPM8 (auch CMR1 = *cold- and menthol-sensitive receptor*) wurde im Jahr 2002 durch zwei unabhängige Arbeitsgruppen als der verantwortliche Kanal für das physiologische Kälteempfinden identifiziert (Peier et al. 2002; McKemy et al. 2002). Durch Klonierung der entsprechenden DNA-Sequenz für den TRPM8 aus Spinalganglien-Neuronen und die Transfektion in CHO- bzw. HEK293-Zelllinien, konnte gezeigt werden, dass dieser Kanal sensibel für Kältereize ($< 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) sowie für Menthol und weitere Agonisten, wie Icilin und Eucalyptol ist. Durch *in situ*-Hybridisierung in Schnitten von Spinal- und Trigeminalganglien wurde festgestellt, dass etwa 5-20% der Neurone den TRPM8 exprimieren und dass es sich dabei vor allem um kleinere Neurone mit einem Durchmesser weniger als $25\text{ }\mu\text{m}$ handelt (Peier et al. 2002). Ähnliche Ergebnisse bezüglich Kälte- und Menthol-sensitiver Neurone in Spinalganglien wurden bereits zuvor publiziert, ohne dass man den verantwortlichen Kanal kannte. So konnte schon 1999 in Calcium-Imaging Versuchen mit kultivierten Neuronen aus Spinalganglien gezeigt werden, dass etwa 13% dieser auf einen Kälte-Stimulus von $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration reagieren und dass für diesen Anstieg eine extrazelluläre Calcium-Quelle vorhanden sein muss (Suto und Gotoh 1999). Ein Jahr später wurden ähnliche Zahlen im Zusammenhang mit der Menthol-Responsivität von kultivierten Ganglien-Neuronen veröffentlicht (Okazawa et al. 2000). Hier zeigten 10% aller untersuchten Neurone eine Zellantwort auf die Zugabe von Menthol und auch hier wurden diese vor allem als kleine Neurone mit einem Durchmesser von unter $25\text{ }\mu\text{m}$ klassifiziert.

Die entscheidende Rolle des TRPM8 für die Thermoregulation konnte in *in vivo* Versuchen gezeigt werden. Die Applikation von Menthol auf die Haut des gesamten Rumpfes von Mäusen führte zur Aktivierung von Wärmebildungs- und -erhaltungsmechanismen, wie Muskelzittern, Aktivierung von braunem Fettgewebe und Vasokonstriktion sowie einer erhöhten Präferenz, sich in einer wärmeren Umgebung

aufzuhalten (Tajino et al. 2007). Außerdem kam es zu einem Anstieg der Körperkerntemperatur, der sich durch Anwendung eines Antipyretikums (Diclofenac) nicht verhindern ließ und somit als Hyperthermie und nicht als Fieber gedeutet wurde. Mäuse aus TRPM8 knockout (TRPM8^{-/-}) Linien zeigten in verschiedenen *in vivo* Studien ein stark gestörtes Kälteempfinden (Bautista et al. 2007; Dhaka et al. 2007; Colburn et al. 2007). Während Wildtyp-Mäuse bei gegebener Möglichkeit eine kalte Umgebung vermeiden, zeigen TRPM8^{-/-} Mäuse eine deutlich erhöhte Toleranz im Kältebereich und eine verringerte Sensibilität bei Icilin-Injektionen, welche bei Wildtyp-Mäusen typische Verhaltensformen wie Schütteln und Springen hervorrufen. Auch auf zellulärer Ebene wurde herausgefunden, dass Neurone aus Spinalganglien von TRPM8^{-/-} Mäusen eine deutlich verringerte Menthol- & Kälte-Sensibilität, wie auch eine verringerte Expression des TRPM8 aufweisen, wobei zu beachten ist, dass nach wie vor 4-8% der untersuchten Neurone auf Kälte reagieren (Colburn et al. 2007; Dhaka et al. 2007; Bautista et al. 2007). Die Verwendung des TRPM8 Antagonisten PBMC (1-Phenylethyl-4-(Benzoyloxy)-3-Methoxybenzyl(2-Aminoethyl)-Carbamate) zeigte *in vitro* eine selektive und vollständige Blockade des Kanals, so dass weder Menthol, noch Kälte (< 20 °C) zu einer Aktivierung von zuvor Menthol-responsiven Neuronen aus Spinalganglien führten (Knowlton et al. 2011). *In vivo* führte eine intraperitoneale Injektion dieses TRPM8 Blockers je nach Dosis zu einer geringen bis starken Hypothermie sowie einem reduzierten Kälteempfinden, welches bei TRPM8^{-/-} Mäusen nicht auftrat. Diese Ergebnisse weisen auf eine entscheidende Beteiligung des TRPM8 am Temperaturempfinden sowie der Regulation der Körpertemperatur hin. In den Jahren 2004 und 2005 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Kobayashi Studien, die eine Co-Expression des TRPM8 mit dem TRPV1 zeigen (Okazawa et al. 2004; Abe et al. 2005). Mittels *in situ*-Hybridisierung konnte diese in 29% der TRPM8 exprimierenden Neurone in Schnitten von Spinalganglien gezeigt werden. In Ca⁺⁺-Imaging Versuchen reagierten 65,1% der Kälte-sensitiven Neurone auch auf einen Hitze-Stimulus von 44 °C. In der zweiten Studie konnte eine Co-Lokalisation immunzytochemisch in etwa 5% der Neurone in Schnitten von Trigemininalganglien nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse werden vor allem im Zusammenhang mit dem paradoxen Kälteempfinden diskutiert, bei dem sehr heiße Temperaturen als kalt empfunden werden. Die Beteiligung des TRPM8 am Empfinden von Kälteschmerz sowie auch an der Kälte-Allodynie, bei der physiologisch nicht schmerzhaft Kältereize als schmerzhaft empfunden werden, wird diskutiert.

1.2. Spinalganglien

Führt ein Reiz an den z.B. in der Haut lokalisierten freien Nervenendigungen zu einer ausreichenden Depolarisation, kommt es zur Ausbildung von Aktionspotentialen durch Öffnung spannungsabhängiger Natrium-Kanäle. Je nach Fasertyp und Grad der Myelinisierung werden Reize in unterschiedlicher Geschwindigkeit in Richtung des ZNS weitergeleitet. Für das Temperatur- und Schmerzempfinden sind vor allem C- und A δ -Fasern wichtig (Einteilung von Fasertypen nach Erlanger und Gasser). C-Fasern sind wenig bis gar nicht myelinisiert und leiten Reize entsprechend langsam weiter (kontinuierliche Reizweiterleitung), während die stark myelinisierten A δ -Fasern zu einer schnellen Reizweiterleitung dienen, da hier die Aktionspotentiale nur an den Ranvier'schen Schnürringen neu gebildet werden müssen (saltatorische Reizweiterleitung). Dies spart nicht nur Zeit, sondern auch Energie, welche nach der Hyperpolarisation zur Wiederherstellung des Ionengleichgewichts durch die Na⁺/K⁺-Pumpe verbraucht wird (von Engelhardt 2015; Behrends et al. 2017). Auf diesem Wege werden Reize zunächst von der Peripherie zu den Spinalganglien geleitet. Diese befinden sich in den *Foramina intervertebrales* entlang der Wirbelsäule und enthalten die Zellkörper der Neurone, welche die freien Nervenendigungen ausbilden. Bei diesen pseudounipolaren Neuronen handelt es sich um relativ große Zellen mit einem Durchmesser von etwa 15-50 μ m (Abbildung 4). Während das periphere Ende des Axons für die Innervation eines rezeptiven Feldes und die Reizaufnahme und –weiterleitung bis zu den Spinalganglien verantwortlich ist, leitet das zentrale Ende den Reiz über den Spinalnerv in das Dorsalhorn des Rückenmarks, wo eine synaptische Übertragung auf sekundäre afferente Neurone stattfindet. Für Temperatur- und Schmerzreize findet dies vor allem in den Laminae I und II statt. Das ankommende Aktionspotential sorgt an der Präsynapse zum Öffnen von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen, was letztlich in der Freisetzung von Neurotransmittern resultiert. Die Modulierbarkeit dieser Calcium-Kanäle und deren Untereinheit $\alpha 2\delta$ -1 scheinen insbesondere im Zusammenhang mit neuropathischem Schmerz in Verbindung zu stehen und stellen einen möglichen Angriffspunkt für eine Therapie dar (Newton et al. 2001; Luo et al. 2001; Field et al. 2006) (siehe Abschnitt 2).

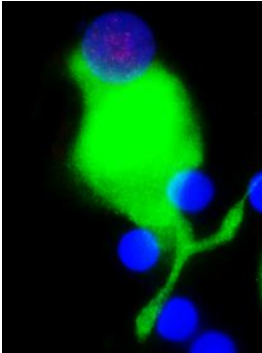


Abbildung 4:

Pseudounipolares Neuron aus einer Primärzellkultur von Spinalganglien
(Abbildung aus eigenen Untersuchungen)

Antikörper gegen MAP2a+b (**grün**), NF-IL6 (**rot**) und Kernfärbung mit DAPI (**blau**)

Neben den Neuronen befinden sich in den Spinalganglien noch weitere Zelltypen. Die Satellitenglia-Zellen haben ähnlich den Astrozyten im zentralen Nervensystem vor allem eine Ernährungs- und Stützfunktion, dienen aber auch einer partiellen Isolation (Hanani 2005). Außerdem sind sie in der Lage, Substanzen aus dem Umfeld von Neuronen aufzunehmen und so das extrazelluläre Milieu konstant zu halten. Sie können aber auch Substanzen, wie inflammatorische Mediatoren produzieren und in die Umgebung abgeben und tragen damit entscheidend zur Neuroinflammation und der Entwicklung von neuropathischem Schmerz bei (Hanani 2005; Blum et al. 2014; Watkins und Maier 2003; Ohara et al. 2009).

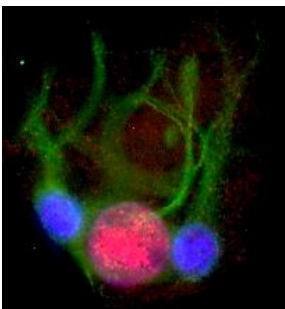


Abbildung 5:

Satellitenglia-Zellen umwachsen Neurone in der Primärzellkultur ähnlich wie auch in Schnitten von Spinalganglien
(Abbildung aus eigenen Untersuchungen)

Antikörper gegen GFAP (**grün**), NF-IL6 (**rot**) und Kernfärbung mit DAPI (**blau**)

Neben den Satellitenglia-Zellen leisten auch ortsständige Makrophagen in den Spinalganglien einen entscheidenden Beitrag im Zusammenhang mit der Immunabwehr, aber auch mit neurodegenerativen Erkrankungen (Hu und McLachlan 2003). Da, anders als im zentralen Nervensystem, im peripheren Nervensystem (PNS) keine Blut-Hirn-Schranke vorhanden ist, spielt hier auch die Invasion von Makrophagen und weiteren Immunzellen aus der Blutbahn eine wichtige Rolle (Jacobs et al. 1976). Im Rahmen der Neuroinflammation sind sie vor allem für die Synthese inflammatorischer Substanzen, wie Zytokinen und Prostaglandinen, verantwortlich. Auf die Rolle der Gliazellen im Zusammenhang mit Neuroinflammation wird in Abschnitt 2 detaillierter eingegangen.

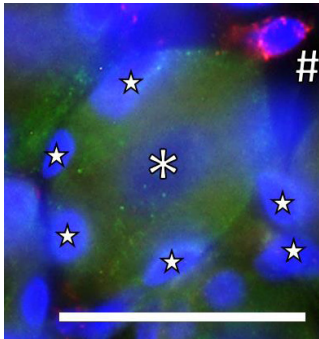


Abbildung 6:

Immunzytochemie eines Spinalganglion-Schnittes:

* = mittelgroßes Neuron (grün)

☆ = Zellkerne der umgebenden Satellitenglia-Zellen

= ortsständiger Makrophage (rot)

(Abbildung aus eigenen Untersuchungen)

Antikörper gegen GFAP (grün), ED-1 (rot) und Kernfärbung mit DAPI (blau)

Maßstabsbalken = 25 µm

1.3. Weitere afferente Verschaltung im ZNS

Die für das Temperatur- und Schmerzempfinden verantwortlichen primären sensorischen Neurone projizieren in das Dorsalhorn des Rückenmarks in die Laminae I und II und sorgen hier für die Ausschüttung von Neurotransmittern, vor allem Substanz P und Glutamat (Willis 2001; Jin et al. 2009; Hwang et al. 2003; Doyle und Hunt 1999; Andrew und Craig 2001; Dhaka et al. 2008). Aber auch viele weitere inhibitorische und exzitatorische Transmitter spielen eine Rolle bei der synaptischen Übertragung (Todd und Spike 1993). Nicht alle eingehenden Signale werden direkt auf die sogenannten Projektionsneurone verschaltet, welche die Information an verschiedene Stellen des Gehirns weiterleiten. Bei einem großen Teil wird diese auch auf so genannte Interneurone übertragen, deren Axone im Rückenmark verbleiben. Sie können die eingehenden Signale auf vielfältige Weise modulieren und spielen in der Verschaltung eine wichtige Rolle. Vereinfacht lassen sie sich in zwei Hauptgruppen unterteilen: inhibitorische und exzitatorische Interneurone. Die Projektionsneurone liegen vor allem in der Lamina I, machen hier aber nur rund 1% aller Neurone aus, während über 95% der Neurone in den Laminae I und II Interneurone sind, davon ca. 30% inhibitorisch (Graham et al. 2007; Polgár et al. 2003). Eine detailliertere weitere Einteilung von Interneuronen ist schwierig, da häufig morphologische Unterschiede nicht mit funktionellen Unterschieden von einzelnen Zellen in Einklang zu bringen sind (Todd 2010; Schaible 2015). Die genaue Funktion der Interneurone im Zusammenhang mit der Vermittlung von Schmerz- und Temperaturreizen sowie deren Modulation auch in Bezug auf Veränderungen dieser Empfindungen (Desensibilisierung und Sensibilisierung) bedarf weiterer Untersuchungen. Neben den Interneuronen spielen hierbei auch absteigende Bahnen aus verschiedenen Gehirnregionen eine wichtige Rolle. Diese können ebenfalls sowohl inhibitorisch als auch facilitatorisch, also die Reizempfindlichkeit steigernd, wirken (Heinricher et al. 2009).

Thermische Reize können auch im Rückenmark selbst wahrgenommen werden. Sowohl Abkühlen, als auch Erwärmen des Rückenmarks führten *in vivo* in verschiedenen Spezies zur Aktivierung der entsprechenden thermoregulatorischen Mechanismen (Simon und Iriki 1970, 1971; Guieu und Hardy 1970; Chai und Lin 1972; Carlisle und Ingram 1973; Pehl et al. 1997). Ob es sich dabei um direkte Thermo-Sensitivität von sekundären

Neuronen im Dorsalhorn oder aber um die Aktivierung der zentralen Enden der primären Neurone handelt, wird diskutiert (Craig et al. 2001; Brock und McAllen 2016).

1.3.1. Weitere Verschaltung von Temperaturreizen

Nach der komplexen Verschaltung im Rückenmark werden Temperaturreize auf der contralateralen Seite über aufsteigende Bahnen in der weißen Substanz in verschiedene Gehirnregionen geleitet (für einen Überblick siehe: Bratincsák und Palkovits 2004). Je nach Zielregion lassen sich verschiedene aufsteigende Bahnen unterscheiden. Ein Teil der Information wird über den *Tractus spinothalamicus* in die Region des Thalamus, genauer in den *ventroposterioren lateralen Nucleus* und den posterioren Anteil des *ventromedialen Nucleus*, geleitet, von wo aus dieser weiter in den *primären somatosensorischen Kortex* gesendet wird (Craig et al. 1994; Craig 2002). Dieser sogenannte *spinothalamocorticale Signalweg* ist vor allem für das bewusste Temperaturempfinden verantwortlich, spielt allerdings im Rahmen der Thermoregulation nur eine untergeordnete Rolle (Morrison und Nakamura 2011; Yahiro et al. 2017). Für diese ist eine Verschaltung über den *lateralen parabrachialen Nucleus* (LPB) und anschließend in die präoptische Region (POA = *preoptic area*) des Hypothalamus von Bedeutung, der *spinoparabrachiale Signalweg*. Tiere, bei denen der LPB bilateral durch Läsionen zerstört wurde, sind außer Stande ihre Körpertemperatur in kalter Umgebung zu regulieren (Kobayashi und Osaka 2003). Periphere Wärme- und Kältereize werden dabei in unterschiedlichen Anteilen des LPB verschaltet. Während Wärmereize vor allem im dorsalen Anteil (LPBd) zu einer Aktivierung von Neuronen führen, ist die Aktivität nach Kältereizen eher im äußeren lateralen Bereich des LPB (LPBe) zu sehen (Bratincsák und Palkovits 2004; Nakamura und Morrison 2008a, 2010). Der wichtigste Transmitter zur Signalübertragung im LPB ist Glutamat. So wurde gezeigt, dass eine lokale Blockade der Glutamat Rezeptoren zu einer vollständigen Unterdrückung sowohl der kälte-, als auch wärmeinduzierten thermoregulatorischen Mechanismen führt (Nakamura und Morrison 2008a, 2010). Mittels retrogradem Tracing konnte gezeigt werden, dass Neurone aus dem LPB, die durch periphere thermische Reize aktiviert wurden, vor allem in den *Nucleus preopticus medianus* (MnPO) projizieren (Nakamura und Morrison 2008a, 2010), der als zentrale Schaltstelle der Thermoregulation gilt (siehe Abschnitt 1.4). Auch auf Ebene des *lateralen parabrachialen Nucleus* im thermoregulatorischen System gibt es Neurone, die auf thermische Reize reagieren. In

elektrophysiologischen *in vitro* Studien in Gehirnschnitten waren 27% der Neurone warm-sensitiv, 10% kalt-sensitiv und 63% insensitiv gegenüber Temperaturveränderungen (Xue et al. 2016).

1.3.2. Weitere Verschaltung von Schmerzreizen

Die weitere afferente Verschaltung von Schmerzreizen verläuft ähnlich der von Temperaturreizen. Mittels retrogradem sowie auch anterogradem Tracing konnten viele zentrale Zielregionen für aufsteigende Axone der Projektionsneurone aus dem Dorsalhorn des Rückenmarks gefunden werden. Diesen werden zum Teil auch unterschiedliche Funktionen des Schmerzempfindens zugeordnet (Todd 2010). Die wichtigsten Zielregionen sind die *caudale ventrolaterale Medulla* (CVLM), der *Nucleus tractus solitarius* (NTS), der *laterale parabrachiale Nucleus* (LPB), die *Substantia grisea periaquaeductalis* (PAG = *periaqueductal grey matter*), und verschiedene Kerngebiete des *Thalamus* (Todd 2010). Dabei ist wichtig zu erwähnen, dass ein Neuron nicht nur in eines, sondern häufig in mehrere dieser Gebiete projiziert (Al-Khater und Todd 2009). In den letzten Jahren wurden zahlreiche quantitative Studien zur Untersuchung der Zielgebiete gemacht. Über 90% der Projektionsneurone in Lamina I im L4-Segment konnten durch retrogrades Tracing aus der CVLM und dem LPB markiert werden. In die PAG projizierten rund 30% der Neurone (Spike et al. 2003). Während in einer Studie aus dem Jahre 2009 nur etwa 5% der Projektionsneurone aus Kerngebieten des Thalamus markiert wurden, wurden in einer Folgestudie derselben Arbeitsgruppe im C7-Segment rund 42% der Projektionsneurone markiert (Polgár et al. 2010). Vereinfacht lassen sich zwei Signalwege unterscheiden. Der *spinothalamische Signalweg* ist auch beim Schmerzempfinden vor allem für den diskriminativen Effekt der Empfindung bedeutend und wird im Thalamus im *ventralen posterolateralen und posteromedialen Nucleus*, sowie im *posterioren triangulären Nucleus* (PoT) verschaltet, von wo aus die Signale weiter in den somatosensorischen Kortex geleitet werden (Craig et al. 1994; Craig 2002; Gauriau und Bernard 2002; Al-Khater et al. 2008). Der Signalweg über den LPB (*spinoparabrachialer Signalweg*) hat hingegen größere Bedeutung in Bezug auf autonome und auch emotionale Aspekte des Schmerzempfindens. Nach der Verschaltung im LPB werden Signale so zum Beispiel in verschiedene Anteile des Hypothalamus weitergegeben. Diese Projektionen stehen im Zusammenhang mit affektiven Verhaltensweisen, wie Aggression, Verteidigung oder Flucht (Gauriau und Bernard

2002), aber auch mit Veränderungen im Bereich des Energiehaushaltes, wie Appetitverlust (Malick et al. 2001) und anderen autonomen Verhaltensänderungen, die bei Schmerz auftreten können. Auch Verschaltungen nozizeptiver Afferenzen über die *Amygdala*, den NTS oder die *Formatio reticularis* sind für die autonome Regulation, zum Beispiel des Herz-Kreislaufsystems oder des Atmungstraktes von Bedeutung und können Herz- und Atemfrequenz, sowie den Blutdruck regulieren (Lima et al. 2002; Boscan et al. 2002). Darüber hinaus ist bekannt, dass durch absteigende Bahnen aus dem ZNS die Übertragung von Schmerzreizen auf Ebene des Dorsalhorns im Rückenmark moduliert werden kann (Ossipov et al. 2010; Heinricher et al. 2009). Die Signale können dabei aus verschiedenen Hirngebieten kommen. Von Bedeutung scheint hier das „periaqueductal gray - rostral ventromedial medulla (PAG-RVM)“ System zu sein. Diese absteigenden Bahnen sind vor allem für das subjektiv unterschiedliche Schmerzempfinden aufgrund verschiedener Gemütszustände, Erfahrungen oder Erinnerungen verantwortlich und werden auch mit dem Placebo-Effekt von vermeintlichen Schmerzmitteln in Zusammenhang gebracht (Ossipov et al. 2010).

1.4. Der *Nucleus preopticus medianus* als zentrale Schaltstelle der Thermoregulation

Der *Nucleus preopticus medianus* (MnPO) ist ein Kerngebiet im Hypothalamus, an der anterioren Wand des dritten Ventrikels und zieht vom *Organum subfornicale* (SFO), als dorsaler Begrenzung, bis hin zum *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) als ventraler Begrenzung um die vordere Kommissur (McKinley et al. 2015). Im Gegensatz zu diesen beiden benachbarten Regionen, die zu den circumventrikulären Organen (CVO's) zählen, besitzt der MnPO kein fenestriertes Endothel, sondern hat eine vollständige Blut-Hirn-Schranke (McKinley et al. 2003). Er gilt als zentrale Schaltstelle für autonome Regulationsmechanismen, wie die Thermoregulation, aber auch für den Flüssigkeits-, Natrium- und Energiehaushalt, die kardiovaskuläre Homöostase und Schlaf (McKinley et al. 2015). Während diese verschiedenen Funktionen im Einzelnen sehr detailliert untersucht wurden, wurde deren Interaktion und die Integration der vielfältigen eingehenden Reize bislang nur wenig untersucht, obwohl sie einander direkt beeinflussen (McKinley et al. 2015). So kommt es zum Beispiel in einer warmen Umgebung zu typischen thermoregulatorischen Mechanismen, wie Schwitzen und zur Dilatation der

peripheren Gefäße. Dabei gehen zum einen Flüssigkeit und Mineralien verloren, zum anderen hat es Einfluss auf den Blutkreislauf und kann bis zum Hitzeschock mit vollständigem Kreislaufkollaps führen. Eine zentrale Verschaltung dieser verschiedenen Funktionen untereinander auf Ebene des MnPO scheint also durchaus naheliegend, allerdings ist dieser Zusammenhang auf zellulärer, neuronaler Ebene bislang nur wenig erforscht und bedarf weiterer Untersuchungen.

Im Folgenden soll sich weitgehend auf die Rolle des MnPO für die Thermoregulation beschränkt werden.

Als thermoregulatorisches Zentrum ist es die Aufgabe des MnPO, afferente Temperaturreize aus der Peripherie, unter Berücksichtigung der Signale zentraler Thermosensoren aus dem Rückenmark und Gehirn, auf efferente Neurone so zu verschalten, dass sie zu entsprechenden thermoregulatorischen Antworten führen. Dabei lassen sich die Faktoren körpereigene Wärmebildung, Wärmeaufnahme von außen, Wärmeverteilung im Körper sowie die Wärmeabgabe durch bestimmte Mechanismen und Verhaltensweisen beeinflussen (von Engelhardt 2015; Behrends et al. 2017). Körpereigene Wärmebildung findet permanent in annähernd jeder Zelle des Körpers durch den unvollständigen Wirkungsgrad der ATP-Bildung bei der Verbrennung von Nährstoffen statt. So werden etwa 80% der aufgenommenen Energie als Wärme abgegeben und nur die verbleibenden 20% für Biosynthesen, Stofftransporte oder mechanische Arbeit wie Muskelkontraktionen genutzt. Diese Wärmebildung lässt sich durch Muskelzittern und die Entkopplung der ATP-Verbrennung im braunen Fettgewebe noch steigern. Die Wärmeaufnahme aus der Umgebung lässt sich vor allem durch bestimmte Verhaltensweisen beeinflussen, wie das Aufsuchen eines wärmeren Ortes, um so vermehrt Wärme über Strahlung, Konduktion und Konvektion aufzunehmen bzw. den Wärmeverlust zu reduzieren. Die Wärmeverteilung im Körper, auch als innerer Wärmestrom bezeichnet, spielt ebenfalls eine wichtige Rolle, da die Wärmebildung vor allem im Körperkern in besonders stoffwechselaktiven Organen stattfindet, und die Wärme zum Großteil über die Blutbahn in die anderen Körperregionen transportiert wird. Dieser Transport über die Blutbahn (Konvektion) lässt sich durch Veränderung des Gefäßdurchmessers beeinflussen. Kontrahieren die Gefäße in der Peripherie, bleibt die Wärme vermehrt im Körperkern. Kommt es zur peripheren Vasodilatation, wird vermehrt Wärme in die Körperschale transportiert und von dort an die Umgebung abgegeben. Die Wärmeabgabe vom Körper an die Umgebung kann über vier wesentliche Mechanismen

stattfinden. Über Wärmestrahlung, über Konduktion an ein nicht-bewegtes Medium, über Konvektion an ein bewegtes Medium, wie Luft oder Wasser, und mittels Evaporation. Wärmestrahlung und Konduktion lassen sich vor allem durch bestimmte Verhaltensweisen beeinflussen, wie die Vergößierung oder Verkleinerung der Kontaktfläche, zum Beispiel beim Zusammenkauern in einer kalten Umgebung. Die Wärmeabgabe mittels Konduktion, lässt sich zum einen durch Beeinflussung der Grenzschicht zu dem kälteren bewegten Medium in der Umgebung (Fell aufstellen, Gefieder aufplustern) verändern, zum anderen durch die Änderung des Mediums selbst, zum Beispiel von Luft zu Wasser, welches eine deutlich höhere Wärmetransportkapazität hat und somit zu einer schnelleren Wärmeabgabe beiträgt. Die Wärmeabgabe über Evaporation findet in einer thermoneutralen Zone nur zu einem geringen Anteil, aber dennoch beständig, über die Haut und Schleimhaut statt. Sie lässt sich jedoch durch bestimmte Mechanismen deutlich steigern. Dazu zählen das Schwitzen und Hecheln, aber auch bestimmte Verhaltensweisen wie das Einspeicheln bei Nagern oder das Suhlen bei Schweinen. Insgesamt gibt es also vielfältige Angriffspunkte, um die Körpertemperatur in einem konstanten Bereich zu halten und Veränderungen in der Umgebungstemperatur bereits entgegen zu wirken, bevor die Körperkerntemperatur sich verändert (von Engelhardt 2015; Behrends et al. 2017).

Dafür ist der erste wichtige Schritt die genaue Detektion von Temperaturunterschieden (Abschnitt 1.1.) und die Weiterleitung dieser Information bis in das Thermoregulationszentrum im MnPO (Abschnitt 1.3.). Obwohl erste Studien 1929 und 1941 schon eine Rolle der präoptischen Region für die Thermoregulation nahelegten, wurde deren Bedeutung und im Besonderen die des MnPO erst seit den 1990er Jahren detaillierter aufgedeckt (McKinley et al. 2015). So konnte gezeigt werden, dass Tiere, die einer warmen oder kalten Umgebung ausgesetzt sind, eine erhöhte Aktivität von Neuronen, im Sinne einer gesteigerten *c-fos* Expression in der präoptischen Region und vor allem im MnPO aufweisen (Scammell et al. 1993; Kiyohara et al. 1995; Maruyama et al. 2003). Durch Kombination von retrogradem Tracing aus dem MnPO und *c-fos* Aktivierung nach Kälte- bzw. Wärmeaussetzung sowie anterogradem Tracing aus dem Dorsalhorn des Rückenmarks konnte die Bedeutung des Signalweges über den LPB zum MnPO für die Thermoregulation nachgewiesen werden (Nakamura und Morrison 2008a, 2008b, 2010). Die zentrale Verschaltung thermoregulatorischer Signale besteht aus einem fein abgestimmten Verhältnis von Aktivierung und Inhibition efferenter Signale aus der

Region des *dorsomedialen Nucleus des Hypothalamus* (DMH) sowie des *dorsalen hypothalamischen Areal* (DHA) (Morrison und Nakamura 2018; Morrison und Nakamura 2011). Ein eingehendes Signal peripherer Kälte führt zu einer Aktivierung von inhibitorischen Neuronen im MnPO, welche ihrerseits die Inhibition von Neuronen in der *medialen präoptischen Region* (MPA) unterdrücken, wodurch die tonische Aktivierung auf Ebene des DMH/DHA überwiegt und es zur Aktivierung der Wärmebildungsmechanismen kommt (siehe Abbildung 7). Ein eingehendes Wärmesignal führt im MnPO zur Aktivierung glutamaterger Neurone, welche ihrerseits GABAerge Neurone in der MPA aktivieren, sodass es zu einer verstärkten Inhibition im DMH/DHA und damit zur Unterdrückung der Wärmebildungsmechanismen kommt (Nakamura und Morrison 2008b, 2011, 2010; Morrison und Nakamura 2018).

Zentrale Thermosensoren im Bereich der präoptischen Region dienen dabei, wie auch jene im Rückenmark und im LPB, einem Feedback-Mechanismus und können ebenfalls die efferenten Signalwege aktivieren (Morrison und Nakamura 2018). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass es Kälte-responsive Neurone im Bereich der präoptischen Region und vor allem auch im MnPO gibt, wobei der verantwortliche Kanal nicht der TRPM8 ist, wie in peripheren Kälte-sensitiven Neuronen (Kobayashi 1986; Abe et al. 2003; Travis und Johnson 1993). Der für die Wärme-Sensitivität von hypothalamischen Neuronen verantwortliche Kanal wurde erst kürzlich als der TRPM2 aufgedeckt. Dessen Funktion scheint vor allem darin zu liegen, den Körper vor einem übermäßigen Temperaturanstieg bei Fieber oder Hyperthermie zu schützen (Song et al. 2016; Siemens und Kamm 2018).

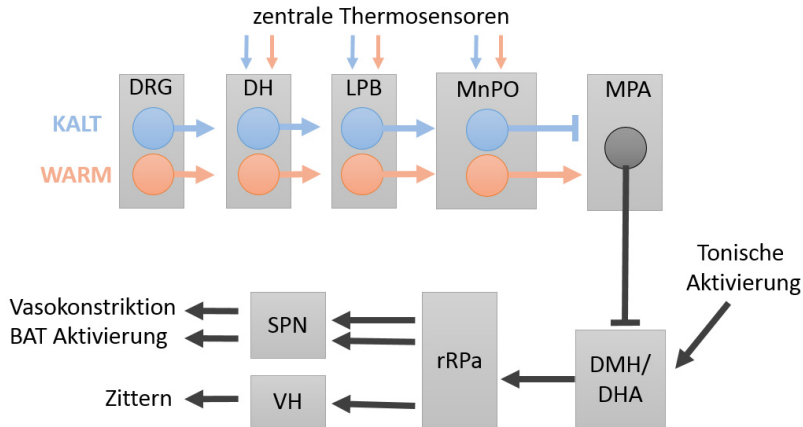


Abbildung 7:

Zentrale Verschaltung affenter Temperatursignale im Hypothalamus auf efferente Neurone zur Aktivierung bzw. Unterdrückung von Wärmebildungsmechanismen (eigene Abbildung, modifiziert nach Morrison und Nakamura 2011, 2018):

Entscheidend für die zentrale Verschaltung thermischer Reize ist ein sensibles Gleichgewicht aus tonischer Aktivierung und Inhibition von Neuronen im dorsalen Hypothalamus (DMH/DHA). Ein peripherer Kälte-Reiz führt über eine Aktivierung der Neurone im Dorsalhorn des Rückenmarks (DH) und LPB zur Aktivierung inhibitorischer Neurone im Bereich des MnPO. Diese projizieren in die MPA, wo sie jene Neurone hemmen, die für die Inhibition der DMH/DHA-Neurone verantwortlich sind. Es kommt also zu einer Inhibition der Inhibition und dadurch zum Überwiegen der tonischen Aktivierung. Dadurch werden Neurone im rRPa aktiviert, die über den Sympathikus zu einer Vasokonstriktion und zur Aktivierung des braunen Fettgewebes führen und außerdem über Motoneurone im Ventralhorn des Rückenmarks das Kältezittern auslösen. Durch einen Wärme-Reiz kommt es zur Aktivierung der inhibitorischen MPA-Neurone und damit zum Überwiegen der Inhibition im DMH/DHA. Wärmebildungs- bzw. -erhaltungsmechanismen werden also gehemmt. Auch zentrale Thermosensoren im Bereich des Rückenmarks, des LPB und des Hypothalamus sind in der Lage, diese Mechanismen zu aktivieren bzw. zu unterdrücken.

DRG = Spinalganglien, DH = Dorsalhorn des Rückenmarks, LPB = *Nucleus parabrachialis lateralis*, MnPO = *Nucleus preopticus medialis*, MPA = Mediale präoptische Region, DMH = dorsomedialer hypothalamischer Nucleus, DHA = dorsale hypothalamische Region, rRPa = rostraler Anteil des *Nucleus raphe pallidus*, SPN = sympathische präganglionäre Neurone, VH = Ventralhorn des Rückenmarks, BAT = Braunes Fettgewebe

→ = Aktivierung des folgenden Neurons

—| = Inhibition des folgenden Neurons

1.5. Die efferente Verschaltung in der Thermoregulation

Die efferente Verschaltung thermoregulatorischer Signale ist sehr komplex und nur teilweise aufgeklärt. Ein Teil der Neurone aus dem DMH/DHA innervieren sympathische Prämotorneurone im rostralen Anteil des *Nucleus raphe pallidus* (rRPa). Hier findet ähnlich dem DMH/DHA ein sensibles Gleichgewicht aus tonischer Aktivierung und Inhibition statt, welches durch die eingehenden Signale moduliert werden kann. Einige der rRPa-Neurone innervieren sympathische präganglionäre Neurone (SPN) im *intermediolateralen Nucleus* des Rückenmarks (Morrison und Nakamura 2018). Dieser Signalweg ist essentiell für die Auslösung der Vasokonstriktion (Tanaka et al. 2011, 2013; Rathner et al. 2001) und der Aktivierung des braunen Fettgewebes (Zhang et al. 2011; Morrison et al. 2012). Für das kälteinduzierte Muskelzittern ist eine Verschaltung über den rRPa ebenfalls essentiell (Nakamura und Morrison 2011), wobei die weitere Verschaltung zu den Motorneuronen im Ventralhorn des Rückenmarks noch nicht endgültig geklärt ist. Die wohl komplexeste und am wenigsten verstandene Antwort auf thermische Veränderungen sind Verhaltensänderungen. Zwar ist bekannt, dass auch hierfür der Signalweg über den LPB und MnPO und nicht über den Thalamus verantwortlich ist, die weitere efferente Verschaltung ist jedoch nur zu einem geringen Teil aufgeklärt und vermutlich so komplex wie die jeweiligen Verhaltensveränderungen selbst (Yahiro et al. 2017).

1.6. Beteiligung des MnPO an der Schmerzverarbeitung

Neben seiner zentralen Bedeutung für Thermoregulation und andere vitale homöostatische Systeme wird dem MnPO von einigen Autoren auch eine Rolle bei der Entstehung einer initialen Hyperalgesie im Rahmen von systemischen Entzündungsprozessen zugesprochen (Saper et al. 2012). Hierbei könnten die stark ausgeprägten Projektionen des MnPO zur *Substantia grisea periaqueductalis* (PAG) im Mittelhirn eine Rolle spielen (Rizvi et al. 1996; Uschakov et al. 2007). Diese ist an der Verarbeitung von Schmerzsignalen beteiligt, indem sie descendierende Bahnen beeinflusst, die als endogene Schmerzkontrollsysteme fungieren (siehe Abschnitt 1.3.2.).

2. Veränderungen der Wahrnehmung thermischer und noxischer Reize im Rahmen von Entzündungen

Im Rahmen von Entzündungen und Verletzungen in der Peripherie kann es zu Veränderungen der Wahrnehmung von externen Reizen kommen. Schmerzhaft Reize werden verstärkt (Hyperalgesie) oder physiologisch nicht schmerzhaft Reize werden als schmerzhaft wahrgenommen (Allodynie). Je nach Art des Reizes spricht man von thermischer oder mechanischer Hyperalgesie / Allodynie. Wie es genau zu der Sensibilisierung peripherer Nerven kommt, ist sehr komplex und nach wie vor nicht vollständig geklärt. Im folgenden Abschnitt wird näher auf einzelne Schritte des bisher bekannten Ablaufs der Sensibilisierung peripherer Nerven eingegangen.

2.1. Bildung neuroaktiver Substanzen nach Verletzung und Entzündung

Durch Entzündungen und Verletzungen in der Haut kommt es zur Aktivierung von ortsständigen Zellen und Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren („inflammatory soup“), die für die Sensibilisierung peripherer Nerven verantwortlich sind (siehe Abbildung 8). Für diese Aktivierung sind vor allem PAMP's (*pathogen associated molecular patterns*) und DAMP's (*damage associated molecular patterns*) verantwortlich, die durch Rezeptoren der Toll-like Familie (TLR's) erkannt werden (Kielian 2006; Roth und Blatteis 2014). In einem ersten Schritt werden lokale Keratinozyten und Makrophagen aktiviert und geben verschiedene neuroaktive Substanzen in die Umgebung frei (Ji et al. 2016). So sind Keratinozyten in der Lage, Adenosintriphosphat (ATP), Prostaglandin (PG) E₂, Nerve growth factor (NGF) und Interleukin 1 beta (IL-1 β) zu bilden und in die Umgebung abzugeben. Lokale Makrophagen tragen durch die Produktion wichtiger proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin 6 (IL-6), IL-1 β und Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), sowie verschiedener Chemokine (vor allem CCL2 = *CC Chemokin Ligand 2*) und PGE₂ ebenfalls zur Bildung der sogenannten „inflammatory soup“ bei (Pinho-Ribeiro et al. 2017). Die Bildung der Zytokine IL-6 und TNF α , induziert durch den TLR-4 Agonisten Lipopolysaccharid

(LPS), ist in Abbildung 9 detailliert dargestellt. Auch Mastzellen geben nach Aktivierung verschiedene wichtige Mediatoren frei. Dazu zählen vor allem Histamin, PGE₂, NGF, TNF α und IL-6 (Pinho-Ribeiro et al. 2017; Moon et al. 2014). Schwann-Zellen, welche die freien Nervenendigungen sowie die aufsteigenden Axone direkt umgeben, sind ebenfalls in der Lage, proinflammatorische Zytokine, wie TNF α und IL-1 β , zu bilden (Ji et al. 2016; Wagner und Myers 1996). Diese ortsständigen Zelltypen sorgen durch Freisetzung inflammatorischer Mediatoren zum einen für die Sensibilisierung freier Nervenendigungen, zum anderen aber auch für eine verstärkte Rekrutierung von Immunzellen aus dem Blut (Chemotaxis), wie Monozyten und neutrophile Granulozyten, welche wiederum zur Zytokin- und Prostaglandin-Bildung befähigt sind und somit mit zeitlichem Versatz ebenfalls zur Sensibilisierung beitragen (Wright et al. 2010). Die Rekrutierung von Blutzellen wird zudem positiv beeinflusst durch die Freisetzung von Substanz P (SP) und Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) aus freien Nervenendigungen, die zu einer Vasodilatation führen und somit zur Verlangsamung des Blutstroms in der betroffenen Region (Pinho-Ribeiro et al. 2017).

Auch im Rahmen von Verletzungen direkt am Nerv selbst kommt es zur Sensibilisierung. Hieran sind vor allem endoneurale Makrophagen beteiligt, die schnell aktiviert werden und zur Rekrutierung weiterer Immunzellen aus der Blutbahn beitragen (Mueller et al. 2001). Neben diesen sorgen, wie oben bereits beschrieben, Schwann-Zellen durch die Bildung von Zytokinen für eine Sensibilisierung von Neuronen. Im Bereich der Spinalganglien kann es ebenfalls im Rahmen von Entzündungen und Verletzungen, aber auch nach Feststellung von nervalen Schäden weiter distal, zur Aktivierung von ortsständigen Makrophagen und Gliazellen (Satellitenglia-Zellen) und einer damit verbundenen Freisetzung von Zytokinen (IL-1 β , IL-6, TNF α) und anderen inflammatorischen Mediatoren, wie PGE₂, kommen (Ji et al. 2016).

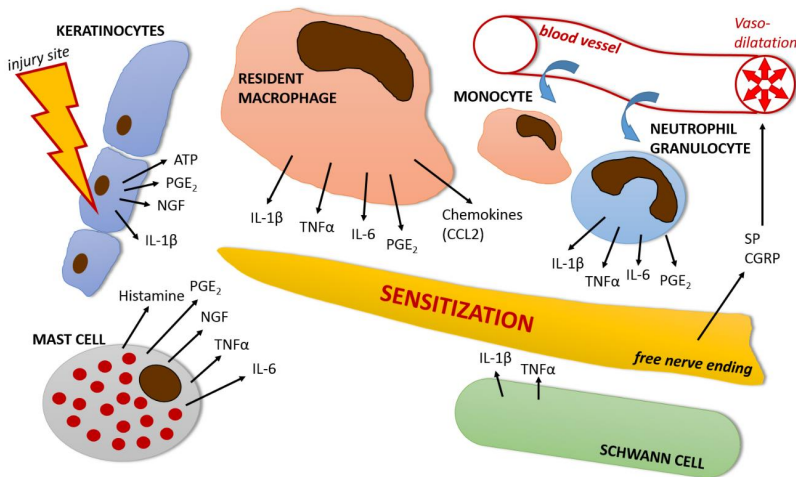


Abbildung 8:

Beteiligung verschiedener Zelltypen an der Bildung neuroaktiver Mediatoren nach Verletzungen und Entzündungen, die zur Sensibilisierung peripherer Nerven führen

(eigene Abbildung modifiziert nach Ellis und Bennett 2013 und Pinho-Ribeiro et al. 2017 und ergänzt durch Ji et al. 2016; Arango Duque und Descoteaux 2014; Wright et al. 2010; Moon et al. 2014)

Die Bildung der hier abgebildeten inflammatorischen Mediatoren und die Beteiligung der verschiedenen Zelltypen ist in Abschnitt 2.1. detailliert beschrieben.

ATP = Adenosintriphosphat, CCL2 = CC Chemokin Ligand 2, CGRP = Calcitonin Gene-Related Peptide, IL-1β = Interleukin 1 beta, IL-6 = Interleukin 6, NGF = Nerve Growth Factor, PGE₂ = Prostaglandin E₂, SP = Substanz P, TNFα = Tumornekrosefaktor alpha

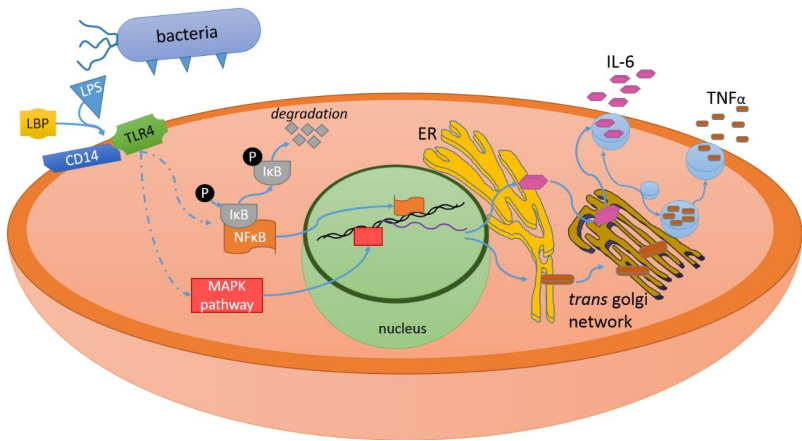


Abbildung 9:

Schematische Darstellung des LPS Signalweges zur Bildung der Zytokine Interleukin 6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF α)
(eigene Abbildung, modifiziert nach Miller et al. 2009)

Lipopolysaccharid (LPS) ist Bestandteil gram-negativer Bakterien und kann von Zellen mit Hilfe des Toll-like Rezeptors 4 (TLR-4) entweder direkt oder nach Bindung an das LPS bindende Protein (LBP) über den Co-Rezeptor CD14 (*Cluster of differentiation 14*) detektiert werden. Daraufhin werden unterschiedliche intrazelluläre Signalwege aktiviert: Der NF κ B- und der MAPK Signalweg. NF κ B (*Nuclear factor kappa B*) liegt im Zytosol gebunden an I κ B (*Inhibitor of kappa B*) in inaktiver Form vor. Kommt es zur Phosphorylierung von I κ B, spaltet dieses sich ab und wird abgebaut. Dadurch kann NF κ B in den Zellkern translozieren und die Transkription von Zielgenen, wie die für IL-6 und TNF α , in Gang setzen. Dies kann gleichermaßen auch über den MAPK Signalweg (*Mitogen activated kinase*) geschehen, über den u.a. Transkriptionsfaktoren wie NF-IL6 aktiviert werden. Die vermehrt gebildete mRNA verlässt den Zellkern und im endoplasmatischen Retikulum (ER) werden durch Ribosomen die Proteine gebildet. Diese liegen zunächst in inaktiver Form vor und werden im Golgi-Apparat in die aktive Form umgewandelt. Auf der *trans*-Seite des Golgi-Apparates (*Trans-Golgi-Netzwerk*) werden sie gelagert, in Vesikel verpackt und schließlich zur Membran transportiert, um via Exozytose aus der Zelle entlassen zu werden.

CD14 = Cluster of differentiation 14, ER = Endoplasmatisches Retikulum, I κ B = Inhibitor of kappa B, IL-6 = Interleukin 6, LBP = LPS-bindendes Protein, LPS = Lipopolysaccharid, MAPK = Mitogen activated protein kinase, NF κ B = Nuclear factor kappa B, NF-IL6 = Nuclear factor interleukin 6, TLR-4 = Toll-like Rezeptor 4, TNF α = Tumornekrosefaktor alpha

2.2. Sensibilisierung von Nerven durch neuroaktive Substanzen

Die Sensibilisierung von Nerven mit einer verstärkten Reizwahrnehmung kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Die wichtigsten Ansatzpunkte hierfür sind zum einen die detektierenden Kanäle selber, wie zum Beispiel die TRP-Kanäle TRPV1 oder TRPM8, zum anderen spannungsabhängige Natrium- und Calcium-Kanäle, welche für die Weiterleitung des Reizes ins Dorsalhorn des Rückenmarks und die dortige Transmitterausschüttung verantwortlich sind. Außerdem kann eine vermehrte Transmitterausschüttung zur gesteigerten Wahrnehmung eines detektierten Reizes führen (siehe Abbildung 10). Diese Mechanismen können dabei auf verschiedenen Ebenen moduliert werden: transkriptional, translational oder posttranslational. Für Veränderungen in der Expression pronozizeptiver Gene auf transkriptionaler Ebene sind hauptsächlich Zytokine (TNF α , IL-1 β , IL-6, u.a.) verantwortlich. Diese Art der Modulation ist verglichen mit posttranslationalen Mechanismen eher langsam, dafür länger anhaltend. Posttranslationale Sensibilisierungsmechanismen können deutlich schneller (binnen weniger Minuten) greifen (Cheng und Ji 2008). Dabei spielen zum einen der Transport von Rezeptoren innerhalb der Zelle sowie deren Einbau in die Zellmembran („channel trafficking“) eine Rolle, zum anderen sind direkte biochemische Modulationen, wie die Phosphorylierung, an den jeweiligen Rezeptoren von Bedeutung. Diese können für eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit oder eine Reduktion der Aktivierungsschwelle sorgen und somit zu einer Verstärkung der Reizwahrnehmung führen (Bhave und Gereau 2004).

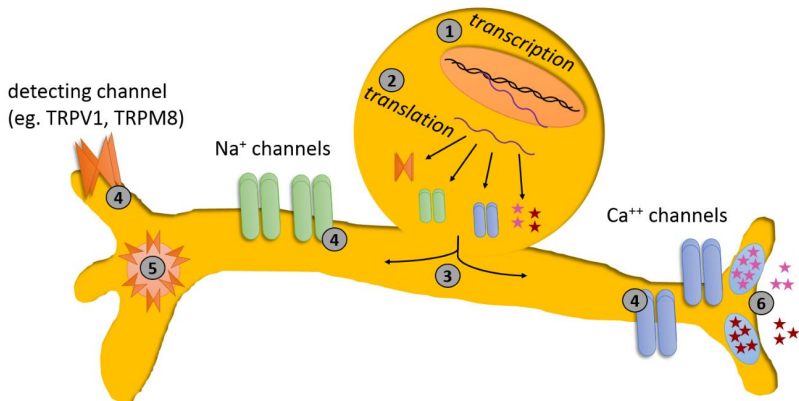


Abbildung 10:

Schematische Darstellung eines primären afferenten Neurons mit den wichtigsten Angriffspunkten für Modulationen, die zu einer Sensibilisierung führen können (eigene Abbildung)

Um eine Verstärkung der Reizwahrnehmung zu erzielen, können verschiedene zelluläre Mechanismen genutzt werden. Zunächst kann es zu einer verstärkten Bildung, im Sinne einer gesteigerten Transkription oder Translation, von Kanälen und Neurotransmittern kommen (1 & 2). Daneben können sogenannte posttranslationale Mechanismen greifen. Hierbei spielen vor allem der Transport entsprechender Kanäle innerhalb der Zelle (3) sowie deren verstärkter Einbau in die Zellmembran aus intrazellulären Speichern eine Rolle (5). Dies bezeichnet man als „channel trafficking“. Außerdem können sowohl die detektierenden Kanäle, wie die TRP-Kanäle, als auch die für die Weiterleitung des Reizes wichtigen Natrium- und Calcium-Kanäle direkt posttranslational moduliert werden (4). Dies erfolgt vor allem mittels Phosphorylierung. Des Weiteren kann auch eine gesteigerte Freisetzung von Neurotransmittern dafür sorgen, dass ein Reiz verstärkt wahrgenommen wird (6).

2.2.1. Transkriptionale Modulation durch die Zytokine IL-6 und TNF α

Die Zytokine IL-6 und TNF α spielen vor allem im Rahmen von Modulationen in der Genexpression eine Rolle (siehe Abbildung 11). Dabei sind sie einerseits für die weitere Bildung proinflammatorischer Mediatoren, im Sinne einer Positiv-Feedback-Schleife verantwortlich. Andererseits tragen sie aber auch wesentlich zur Sensibilisierung peripherer Nerven bei, indem sie die Transkription pronozizeptiver Substanzen (SP, CGRP, *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), TRPV1) steigern (Cheng und Ji 2008).

TNF α kann über zwei Rezeptoren agieren, den TNF Rezeptor 1 und 2 (TNFR1 bzw. 2). Während der TNFR2 vor allem in nicht-neuronalen Zellen exprimiert wird, konnte gezeigt werden, dass der TNFR1 auch von Neuronen aus Spinalganglien exprimiert wird (Li et al. 2004; Henssleek et al. 2007). Darunter befinden sich vor allem auch solche, die den TRPV1 sowie Substanz P und CGRP exprimieren und damit mutmaßlich nozizeptive Neurone sind. Insgesamt konnte eine Co-Lokalisation von einem der beiden TNF Rezeptoren in über 90% der TRPV1 exprimierenden Neurone nachgewiesen werden (Khan et al. 2008). Für den Effekt der Sensibilisierung scheint der TNFR1 von Bedeutung zu sein, da Antikörper gegen diesen eine induzierte Überempfindlichkeit auf thermische Reize erfolgreich reduzieren konnten, während Antikörper gegen den TNFR2 keinen Effekt zeigten (Sommer et al. 1998). Durch Bindung von TNF α an den TNFR1 können verschiedene intrazelluläre Signalwege aktiviert werden. Für die Modulation auf transkriptionaler Ebene spielt vor allem der Signalweg über den *Nuclear factor kappa B* (NF κ B) eine wichtige Rolle (Chen und Goeddel 2002; Rahman et al. 2007; Baud und Karin 2001). Dieser liegt im Zytoplasma von Zellen gebunden an I κ B (*Inhibitor of kappa B*) in einer inaktiven Form vor. Nach Bindung von TNF α an den TNFR1 kommt es zur Aktivierung der IKK (*Inhibitor of kappa B kinase*), die in der Lage ist, I κ B zu phosphorylieren und damit von NF κ B abzuspalten. In dieser ungebundenen Form kann NF κ B in den Zellkern translozieren und die Transkription von bestimmten inflammatorischen Zielgenen in Gang setzen (Myers et al. 2006). Neben dem NF κ B Signalweg kommt es nach Bindung von TNF α an den TNFR1 auch zur Aktivierung des Signalweges über MAP Kinasen (*Mitogen activated protein kinases*), deren Rolle in diesem Zusammenhang aber noch diskutiert wird. Zu dieser Gruppe gehört die p38 MAPK, die ERK (*Extracellular-signal regulated kinase*) und die JNK (*C-Jun N-terminal kinase*) (Cheng und Ji 2008; Myers et al. 2006). Die Funktionen der MAP Kinasen sind

vielfältig und reichen von der transkriptionalen über die translationale bis hin zur posttranslationalen Modulation. Ihre Bedeutung im Zuge der peripheren Sensibilisierung von Schmerzneuronen wurde in mehreren Studien gezeigt. So zeigten Neurone aus Spinalganglien nach TNF α -Applikation eine gesteigerte Expression von phosphorylierter ERK (Takahashi et al. 2006). Zudem führt eine Blockade der ERK, aber auch der p38 MAPK zu einer verminderten Sensibilisierung (Bron et al. 2003; Ji et al. 2002; Schäfers et al. 2003). Auf welchem Wege MAP Kinasen zur Sensibilisierung beitragen, ist jedoch umstritten. Aktivierte MAP Kinasen können nach Translokation in den Zellkern durch Phosphorylierung verschiedener intrazellulärer Transkriptionsfaktoren, wie c-Myc, Elk-1, c-Fos oder c-Jun, die Transkription von Zielgenen induzieren (Woolf und Costigan 1999). Dazu zählen zum einen Ionenkanäle, wie der TRPV1, aber auch spannungsabhängige Natrium- und Calcium-Kanäle. Zum anderen wird auch die Transkription von Neuromodulatoren, wie Substanz P, CGRP und BDNF, aber auch von Zytokinen, wie IL-1 β und TNF α , in Gang gesetzt (Cheng und Ji 2008). Daneben wird durch die ERK auch die *Cyclin-dependent kinase 5* (Cdk5) reguliert, die zusammen mit p35 als Komplex in der Lage ist, den TRPV1 posttranslational zu phosphorylieren (Utreras et al. 2009; Rozas et al. 2016; Jendryke et al. 2016) (siehe Abschnitt 2.2.2.).

Interleukin 6 (IL-6) wird geringgradig zeitlich verzögert und induziert durch TNF α gebildet (Lee et al. 2009). Für die Sensibilisierung peripherer Nerven ist dieses Zytokin wie auch TNF α von entscheidender Bedeutung. So zeigten IL-6 knockout Mäuse (IL-6^{-/-}) in einem Modell zur Untersuchung von inflammatorischem Schmerz eine abgeschwächte thermische und mechanische Hyperalgesie (Xu et al. 1997). Außerdem zeigten nozizeptive Neurone nach Stimulation mit IL-6 einen gesteigerten Ionenstrom als Antwort auf Wärme-Stimuli, sowie eine Reduktion der thermischen Aktivierungsschwelle und eine gesteigerte Freisetzung des Neurotransmitters CGRP nach einem thermischen Stimulus (Obreja et al. 2005). Dabei ist zu beachten, dass IL-6 allein *in vitro* keinen Sensibilisierungseffekt hat, sondern der IL-6 Rezeptor in löslicher Form hinzugegeben werden muss, damit beide gemeinsam an die gp130 (Glykoprotein 130) Einheit binden können. Der IL-6 Rezeptor selbst wird also nicht von nozizeptiven Neuronen exprimiert, sondern *in vivo* vermutlich von anderen Zellen in die Umgebung entlassen (Obreja et al. 2002b). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Mäuse, bei denen gp130 spezifisch in Nozizeptoren ausgeschaltet ist, deutlich verringerte Symptome von inflammatorischem Schmerz aufzeigen (Andratsch et al. 2009). Bindet

der IL-6/IL-6-Rezeptor Komplex an die gp130 Einheit, kommt es zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege (siehe Abbildung 11). Hierbei müssen wieder transkriptionale von posttranslationalen Signalwegen differenziert werden (siehe Abschnitt 2.2.2.). Im Wesentlichen können nach Aktivierung der gp130 Einheit drei induzierbare Signalwege unterschieden werden: Über JAK/STAT (*Janus activated kinase / Signal transducer and activator of transcription*), über PI3K/Akt (*Phosphatidylinositol-3-Kinase / Akt kinase (auch Proteinkinase B)*) oder über MAP Kinasen (Zhou et al. 2016). Bei dem JAK/STAT Signalweg kommt es nach Aktivierung der gp130 Einheit zur Phosphorylierung einer *Janus activated kinase* (JAK), die ihrerseits im Zytosol vorliegendes STAT3 phosphorylieren kann. Phosphoryliertes STAT3 dimerisiert und kann in dieser aktiven Form in den Zellkern translozieren, um die Transkription von bestimmten Zielgenen zu induzieren. Eines dieser Zielgene ist SOCS3 (*Suppressor of cytokine signaling 3*), welches in einer Negativ-Feedback-Schleife die JAK inhibiert und damit zu einer verminderten Aktivierung von STAT3 beiträgt (Kisseleva et al. 2002; Heinrich et al. 1998). Über die PI3K kann außerdem die Kinase Akt phosphoryliert werden, die ihrerseits die IKK (*Inhibitor of kappa B kinase*) aktiviert, welche IκB durch Phosphorylierung vom NFκB-Dimer abspaltet, welches dann in seiner aktiven Form ebenfalls in den Zellkern wandern kann. Der dritte Signalweg verläuft über die MAP Kinasen, wobei hier die p38 MAPK sowie die ERK von Bedeutung sind. Diese sind in ihrer phosphorylierten Form in der Lage, in den Zellkern zu translozieren und Transkriptionsfaktoren, wie den *Nuclear factor interleukin 6* (NF-IL6), zu aktivieren. Zielgene, deren Transkription durch Interleukin 6 über diese Signalwege induziert wird, sind vor allem weitere proinflammatorische Mediatoren, wie C-reaktives Protein oder das LPS bindende Protein (LBP), sowie Transkriptionsfaktoren, wie Jun B, c-Fos oder C/EBPδ. Aber auch die gp130 Einheit selbst wird durch IL-6 vermehrt exprimiert (Heinrich et al. 1998).

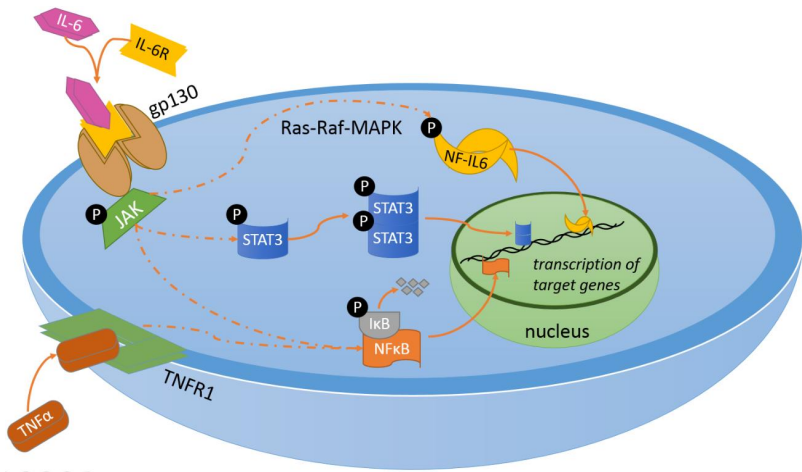


Abbildung 11:

Schematische Darstellung intrazellulärer Signalwege, die durch IL-6 und TNFα aktiviert werden (eigene Abbildung modifiziert und zusammengefasst aus Zhou et al. 2016; Myers et al. 2006; Miller et al. 2009)

TNFα bindet am TNFR1, wodurch der Signalweg über NFκB aktiviert wird. Nach Phosphorylierung und Abspaltung von IκB, kann NFκB in den Zellkern translozieren. Interleukin 6 bindet zunächst an den IL-6 Rezeptor, welcher in löslicher Form vorliegen kann. Der IL-6/IL-6-Rezeptor Komplex bindet an die gp130 Einheit und kann intrazelluläre Signalwege aktivieren. Durch Phosphorylierung wird eine *Janus activated kinase* (JAK) aktiviert, die den Transkriptionsfaktor STAT3 phosphorylieren kann, welcher nach Dimerisierung in den Zellkern translozieren kann. Daneben kommt es auch durch IL-6 zur Aktivierung des NFκB Signalweges. Ein dritter Signalweg verläuft über die Aktivierung von MAP Kinasen (p38 MAPK, ERK, JNK), die ebenfalls in der Lage sind, in den Zellkern zu translozieren und hier bestimmte Transkriptionsfaktoren, wie NF-IL6, zu aktivieren. Eine Aktivierung der oben genannten Transkriptionsfaktoren führt zur Einleitung der Transkription bestimmter Zielgene, die je nach Zelltyp variieren können. Für Nozizeptoren könnte vor allem eine gesteigerte Expression von Ionenkanälen, wie dem TRPV1, oder Neuromodulatoren, wie Substanz P oder CGRP, von Bedeutung sein.

CGRP = Calcitonin gene-related peptide, ERK = Extracellular-signal regulated kinase, gp130 = Glycoprotein 130, IκB = Inhibitor of kappa B, IL-6 = Interleukin 6, IL-6R = Interleukin 6 Rezeptor, JAK = Janus activated kinase, JNK = c-Jun N-terminal kinase, MAPK = Mitogen activated protein kinase, NF-IL6 = Nuclear factor interleukin 6, NFκB = Nuclear factor kappa B, STAT3 = Signal transducer and activator of transcription 3, TNFα = Tumornekrosefaktor alpha, TNFR1 = Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1, TRPV1 = Transient receptor potential vanilloid 1

2.2.2. Posttranslationale Modulation des TRPV1

Für die Veränderung der Wahrnehmung noxischer Reize ist vor allem die posttranslationale Modulation des TRPV1 mittels Phosphorylierung verantwortlich. Diese kann durch verschiedene Botenstoffe ausgelöst werden, zu denen vor allem die in Abschnitt 2.1. genannten Mediatoren gehören, die im Rahmen von Entzündungen durch verschiedene Zelltypen ausgeschüttet werden. Diese aktivieren intrazelluläre Signalkaskaden, welche letztlich zur Phosphorylierung führen. Dies äußert sich in einer gesteigerten Offenwahrscheinlichkeit des Kanals, einer verringerten Aktivierungsschwelle oder einer reduzierten Desensibilisierung des Kanals. Daneben sind einige der Substanzen dazu in der Lage, die Proteinexpression des TRPV1 und dessen Einbau in die Zellmembran zu steigern (Huang et al. 2006a, b). Zudem können sogenannte „sleeping nociceptors“ aktiviert werden, also Neurone die zuvor nicht auf noxische Reize reagiert haben (Mizumura 1997).

Eine Übersicht ist in Abbildung 12 dargestellt. Auf die Rolle der einzelnen inflammatorischen Mediatoren wird in den folgenden Abschnitten eingegangen.

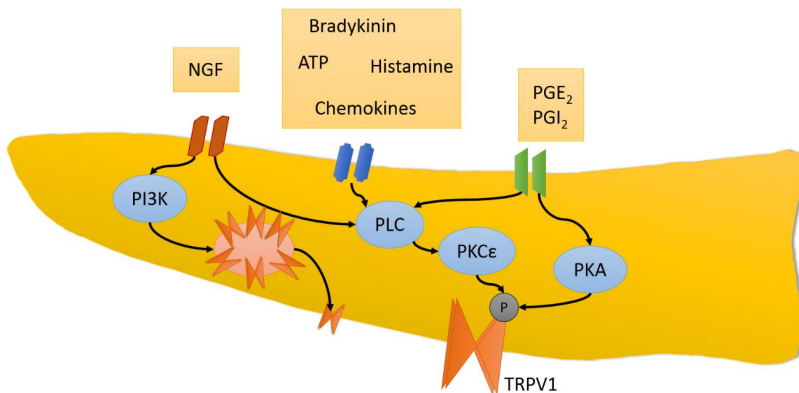


Abbildung 12:

Übersicht über intrazelluläre Signalkaskaden, die zu einer Phosphorylierung bzw. einem gesteigerten Membraneinbau des TRPV1 führen können

(eigene Abbildung: modifiziert nach Huang et al. 2006a)

Die verschiedenen Signalwege sind im Abschnitt 2.2.2. („PGE₂“, „NGF“, „weitere inflammatorische Mediatoren“) detailliert erklärt.

ATP = Adenosintriphosphat, NGF = Nerve growth factor, PGE₂ = Prostaglandin E₂, PGI₂ = Prostaglandin I₂, PI3K = Phosphoinositid-3-Kinase, PKA = Proteinkinase A, PKCε = Proteinkinase C epsilon, PLC = Phospholipase C, TRPV1 = Transient receptor potential vanilloid 1

Prostaglandin E₂ und I₂

Die Prostaglandine PGE₂ und PGI₂ spielen im Rahmen der Sensibilisierung peripherer Nerven eine entscheidende Rolle. Beide sind in der Lage, die Zellantwort von Nozizeptoren auf den TRPV1 Agonisten Capsaicin in gleichem Maße zu steigern (Pitchford und Levine 1991; Bley et al. 1998). Dafür agieren sie an den jeweiligen Rezeptoren (EP₁₋₄ bzw. IP), die von Nozizeptoren exprimiert werden, und aktivieren unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden. Über den EP₁ Rezeptor wird die Phospholipase C (PLC) aktiviert, die wiederum über Diacylglycerin (DAG) die Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Im Rahmen der Sensibilisierung von Schmerzneuronen ist vor allem die PKCε von Bedeutung (Cesare et al. 1999). Diese ist in der Lage, den TRPV1 zu phosphorylieren, was zu einer Sensibilisierung des Kanals, aber nicht zur Aktivierung, führt. Die für die PKC entscheidenden Phosphorylierungsstellen sind dabei die Aminosäuren S(Serin)800, S502 und T(Threonin)704 (Bhave et al. 2003). Dabei ist nach wie vor nicht geklärt, ob die Phosphorylierung der unterschiedlichen Aminosäuren entsprechend unterschiedliche Effekte auf die veränderte Wahrnehmung chemischer (Capsaicin) und thermischer Reize, sowie auf pH-Veränderungen hat (Wang et al. 2015; Bhave et al. 2003; Vellani et al. 2001). Neben der Phosphorylierung der PKC ist die PLC auch in der Lage, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositoltriphosphat (IP₃) zu phosphorylieren. PIP₂ steht in Verdacht, eine Aktivierung des TRPV1 tonisch zu unterdrücken, weshalb ein Abbau zu einer verstärkten Aktivität beitragen könnte (Prescott und Julius 2003). Diese Hypothese konnte allerdings bislang nicht eindeutig belegt werden und wird von einigen Autoren hinterfragt (Stein et al. 2006; Zhang et al. 2008). Über den EP₂ und den EP₄ Rezeptor wird vor allem die Adenylatcyclase aktiviert, welche Adenosintriphosphat (ATP) in cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) umwandeln kann. Dieses aktiviert als *second messenger* wiederum die Proteinkinase A, die dann in der Lage ist, den TRPV1 zu phosphorylieren (Bley et al. 1998; Zhang et al. 2008). Dabei unterscheiden sich die Phosphorylierungsstellen von denen der PKC. So greift die PKA vor allem an den Aminosäuren T370 und S116 an und moduliert hierüber die Sensibilisierung des TRPV1 (Bhave und Gereau 2004). PGI₂ agiert am IP Rezeptor und kann sowohl über den PKA- als auch über den PKC Signalweg zur Phosphorylierung des TRPV1 beitragen (Moriyama et al. 2005; Bley et al. 1998).

Nerve growth factor (NGF)

NGF ist eine der ersten Substanzen, die im Rahmen von Entzündungen schnell freigesetzt wird und ebenfalls zur Sensibilisierung von Nozizeptoren beiträgt. Auch auf zellulärer Ebene konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von NGF ein Teil der Schmerz-sensitiven Neurone stärker auf Stimuli wie Hitze oder Capsaicin reagiert (Galoyan et al. 2003; Bonnington und McNaughton 2003). NGF agiert dabei an dem Rezeptor trkA (*Tropomyosin receptor kinase A*), der ähnlich den im vorigen Abschnitt genannten EP Rezeptoren verschiedene intrazelluläre Signalwege in Gang setzen kann. Durch den Einsatz von verschiedenen Inhibitoren für Schlüsselenzyme wurde deren Rolle für die NGF-induzierte Sensibilisierung nachgewiesen. Galoyan et al. zeigten, dass durch Inhibition der Phospholipase C die durch NGF gesteigerte Zellantwort auf einen Hitze-Stimulus vollständig gehemmt wird (Galoyan et al. 2003). Dabei handelt es sich um den Signalweg über die PLC γ , welche wiederum die PKC ϵ aktiviert und somit zur Phosphorylierung des TRPV1 an den Aminosäuren S502 und S800 führt (Zhang et al. 2005). Eine Hemmung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) reduzierte ebenfalls eine durch NGF gesteigerte Capsaicin Antwort (Bonnington und McNaughton 2003). Der hierfür verantwortliche Signalweg führt über die Aktivierung der PKC δ , welche ihrerseits die Tyrosinkinase Src aktiviert. Diese ist in der Lage, intrazellulär gelagerte TRPV1-Kanäle an der Stelle Y200 zu phosphorylieren und dadurch für eine erhöhte Membranexpression des Kanals zu sorgen („TRPV1 trafficking“) (Zhang et al. 2005; Stein et al. 2006; Puntambekar et al. 2005). Daneben kann durch NGF der Ras-Raf-MAPK (*Mitogen activated protein kinase*) Signalweg aktiviert werden, welcher zu einer gesteigerten Proteinexpression des TRPV1 führt, ohne dass dabei die Transkription gesteigert wird (Puntambekar et al. 2005; Bron et al. 2003; Ji et al. 2002). Über diesen Weg kann auch die Anzahl der immunzytochemisch TRPV1 positiven Neurone gesteigert werden (Ji et al. 2002). Die Bildung von Neurotransmittern wird ebenfalls durch NGF reguliert. So steigt die transkriptionale Expression von Substanz P und CGRP nach Zugabe von NGF (Lindsay und Harmar 1989; Woolf et al. 1994).

Weitere inflammatorische Mediatoren

Neben Prostaglandinen und NGF sind auch Bradykinin, Histamin und ATP im Zusammenhang mit der Sensibilisierung von Nozizeptoren detailliert untersucht worden. **Bradykinin** agiert über den B1 oder B2 Rezeptor (Soares et al. 2017). Über den PKC ϵ Signalweg kommt es wie zuvor beschrieben zur Phosphorylierung des TRPV1 (Zhang et al. 2008; Cesare et al. 1999). Dadurch sinkt zum einen die Aktivierungstemperatur (Cesare und McNaughton 1996; Sugiura et al. 2002), zum anderen steigt die Offenwahrscheinlichkeit des Rezeptors (Vellani et al. 2001). Auch **Histamin** führt zu einer gesteigerten Zellantwort auf thermische Reize, welche durch Blockade der PKC mittels Staurosporin reduziert wurde (Mizumura et al. 2000). Allerdings hat Histamin auch direkte exzitatorische Effekte und ist in der Lage, Nozizeptoren zu aktivieren. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von Antagonisten am Histamin Rezeptor die Entwicklung von thermischer Hyperalgesie stark reduziert wird (Zuo et al. 2003). Auch **ATP** ist im Rahmen der Sensibilisierung peripherer Nerven von Bedeutung. So konnte in elektrophysiologischen Versuchen gezeigt werden, dass ATP die Ionenströme, hervorgerufen durch Capsaicin oder Protonen, signifikant verstärkt und den Aktivierungsschwellenwert für thermische Reize von 42 °C auf 35 °C herabsetzt (Tominaga et al. 2001). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass auch für die Sensibilisierung durch ATP die Proteinkinase C von Bedeutung ist. Der für diesen Effekt verantwortliche ATP Rezeptor ist eher der P2Y₂ (Purinozeptor 2) als der P2Y₁. Hier konnte eine Co-Expression in TRPV1 exprimierenden Neuronen gezeigt werden. Außerdem zeigten knockout Mäuse, welche den P2Y₁ Rezeptor nicht mehr exprimieren können, in *in vivo* Versuchen nach wie vor thermische Hyperalgesie und auch auf zellulärer Ebene verstärkte Zellantworten (Moriyama et al. 2003). Für die Verarbeitung von Schmerzreizen und deren Modulation im Rahmen von Entzündungen spielt auch die Gruppe der **Chemokine** eine wichtige Rolle, deren Bedeutung aber noch nicht im Detail geklärt ist. Es konnte gezeigt werden, dass bei peripherer Injektion der Chemokine CCL2, CCL3, CCL5 und CXCL12 Schmerzverhalten ausgelöst wird (Kiguchi et al. 2012). Dabei sind diese zum einen in der Lage, Nozizeptoren direkt zu aktivieren (Oh et al. 2001). Zum anderen können sie den TRPV1 über den PLC β -PKC Signalweg modulieren (White et al. 2007). In den letzten Jahren ist ein weiterer Mechanismus in den Fokus der Untersuchungen gerückt. 2006 konnten Wadachi et al. zeigen, dass Nozizeptoren, die den TRPV1 exprimieren, zum Teil auch den Toll-like Rezeptor 4 (TLR-4) bilden und damit

auch direkt auf inflammatorische Stimuli, wie das in Zellmembranen gram-negativer Bakterien exprimierte **Lipopolysaccharid** (LPS) reagieren können (Wadachi und Hargreaves 2006). LPS kann somit an Nozizeptoren binden und diese direkt aktivieren (Diogenes et al. 2011). Es führt aber auch zu einer Sensibilisierung der Nozizeptoren auf noxische Reize, wie Capsaicin, wobei der intrazelluläre Signalweg noch nicht endgültig geklärt ist. Auch die in Abschnitt 2.2.1. beschriebenen **Zytokine** TNF α und IL-6 haben neben ihrer Funktion auf transkriptionaler Ebene auch die Fähigkeit die posttranslationale Modulation des TRPV1 zu beeinflussen. TNF α führt über den ERK Signalweg und eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors Egr-1 zu einer vermehrten Expression und Aktivität der *Cyclin-dependent kinase 5* (Cdk5), die den TRPV1 an der Aminosäure T(Threonin)406 phosphorylieren kann (Jendryke et al. 2016; Utreras et al. 2009). IL-6 ist in der Lage, den TRPV1 über den PKC δ Signalweg zu modulieren. Dabei kommt es nach Binden des IL-6/IL-6-Rezeptor Komplexes an die gp130 Einheit zur Aktivierung einer *Janus activated kinase* (JAK), welche die Proteinkinase C δ aktiviert, die schließlich den TRPV1 direkt phosphorylieren kann und damit zu einer gesteigerten Zellantwort auf thermische Reize und einer Reduzierung der Aktivierungsschwelle auf thermische Reize beiträgt (Obreja et al. 2005). Auch für Interleukin 1 beta (IL-1 β) sind posttranslationale Modulationsmechanismen beschrieben. Dabei führt die Bindung von IL-1 β an den IL-1 Rezeptor zur Aktivierung von Proteinkinasen sowie Protein Tyrosin Kinasen (PTK), welche in der Lage sind, den TRPV1 zu phosphorylieren. Eine Blockade des jeweiligen Signalweges führte zur Reduzierung des Sensibilisierungseffektes von IL-1 β (Obreja et al. 2002a).

2.2.3. Posttranslationale Modulation des TRPM8

Der kältesensitive TRPM8 ist bislang, auch aufgrund seiner späteren Entdeckung, deutlich weniger intensiv untersucht worden als der TRPV1. Es konnten allerdings schon interessante Effekte inflammatorischer Stimuli auf den TRPM8 nachgewiesen werden. Dabei kommt es, entgegengesetzt zu den Beobachtungen beim TRPV1, zu einer Desensibilisierung des Kanals durch Bradykinin und Prostaglandin E₂ (Linte et al. 2007). Bradykinin bindet an den Bradykinin Rezeptor 2 (B2), was zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC) führt (vergleiche Abschnit 2.2.2.). Diese spaltet PIP₂ in DAG und IP₃, wobei DAG wiederum die Proteinkinase C aktivieren kann. Diese führt hier allerdings anders als beim TRPV1 nicht zur Sensibilisierung des Kanals, sondern zu einer

Desensibilisierung (Daniels et al. 2009; Latorre et al. 2011; Premkumar et al. 2005). Der hierfür verantwortliche Mechanismus ist nicht geklärt (Yudin und Rohacs 2012). Prostaglandin E₂ agiert an EP Rezeptoren und führt vor allem zur Aktivierung der Adenylatcyclase, die ATP zu cAMP abbaut. cAMP ist in der Lage, die Proteinkinase A zu aktivieren, welche den TRPM8 durch Phosphorylierung desensibilisiert (Latorre et al. 2011). Auch durch NGF kam es zu einer verminderten Zellantwort auf Menthol- und Kälte-Reize und damit zu einer Desensibilisierung des TRPM8 (Liu und Qin 2005). Diese Effekte weisen auf eine Art Gegenspieler-Rolle des TRPM8 zum TRPV1 hin. Eine Herabregulation einer möglichen schmerzlindernden Wirkung des TRPM8 könnte dabei zu der gesteigerten Schmerzwahrnehmung durch den TRPV1 zusätzlich beitragen.

2.2.4. Posttranslationale Modulation spannungsabhängiger Natrium- und Calcium-Kanäle

Eine weitere Möglichkeit der Modulation, die zu einer Steigerung der Schmerzwahrnehmung führt, besteht darin, die Weiterleitung des Reizes zu beeinflussen. Zunächst sind hierfür spannungsabhängige Natrium-Kanäle von Bedeutung, die sich öffnen, wenn die Membranspannung sich verändert. Diese liegt bei Nervenzellen in Ruhe bei etwa -80 mV. Wird zum Beispiel ein Nozizeptor durch einen noxischen Stimulus aktiviert, kommt es zum Einstrom von Kationen durch den TRPV1 und dadurch steigt das Membranpotential. Erreicht es einen Schwellenwert von etwa -50 mV, öffnen schlagartig spannungsabhängige Natrium-Kanäle, welche aufgrund des Konzentrationsgradienten zu einem Natriumeinstrom und damit einem weiteren Anstieg des Membranpotentials auf bis zu +30 mV führen (von Engelhardt 2015; Behrends et al. 2017). Durch Veränderungen an spannungsabhängigen Natrium-Kanälen kann es also zu einer verstärkten Reizweiterleitung kommen. Für die Vermittlung und Modulation von Schmerzreizen ist besonders die Gruppe der Tetrodotoxin (TTX)-resistenten Natrium-Kanäle und hier vor allem der Na_v1.7, der Na_v1.8 (auch SNS für *sensory neuron specific*) und der Na_v1.9 (auch SNS2) von Bedeutung (Bhave und Gereau 2004; Amaya et al. 2000). In elektrophysiologischen Studien an einzelnen Schmerzneuronen konnte gezeigt werden, dass inflammatorische Mediatoren, wie PGE₂, Adenosin oder Serotonin, den Natriumstrom durch spannungsabhängige, Tetrodotoxin-resistente Natrium-Kanäle steigern können (Gold et al. 1996b). Der verantwortliche Signalweg verläuft für den Na_v1.8 vor allem über die Proteinkinase A (PKA), die durch Phosphorylierung an den

Aminosäuren S(Serin)463, S487, S499, S510 und S536 die Erregbarkeit und den Ionenstrom steigern kann (England et al. 1996; Fitzgerald et al. 1999; Bhawe und Gereau 2004). Auch TNF α ist in der Lage, über den p38 MAPK Signalweg die Erregbarkeit spannungsabhängiger, TTX-resistenter Natrium-Kanäle zu steigern (Jin und Gereau 2006).

Gelangt ein eingehendes Aktionspotential an die Präsynapse, so sorgt es durch Aktivierung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle für einen Einstrom von Ca⁺⁺-Ionen, wodurch die Ausschüttung der Transmitter aus Vesikeln in den synaptischen Spalt induziert wird (Doan 2010). Eine Modulation an den Calcium-Kanälen kann also die Transmitterausschüttung und damit die Reizübertragung auf ein sekundäres afferentes Neuron bzw. ein Interneuron im Dorsalhorn des Rückenmarks direkt beeinflussen. Spannungsabhängige Calcium-Kanäle werden in drei Familien eingeteilt, Ca_v1 (L-Typ), Ca_v2 mit den Untergruppen Ca_v2.1 (P/Q-Typ), Ca_v2.2 (N-Typ) und Ca_v2.3 (R-Typ), sowie Ca_v3 (T-Typ). Sie setzen sich dabei aus den Untereinheiten α_1 , β , γ und $\alpha_2\delta$ zusammen (Doan 2010). Für die Übertragung nozizeptiver Reize an der Synapse sind besonders die Typen der Ca_v2 Familie interessant. Kanäle vom P/Q-Typ (Ca_v2.1) werden an der Präsynapse im Dorsalhorn exprimiert und sind an der Ausschüttung von diversen sowohl exzitatorischen (Glutamat, Dopamin, Serotonin) als auch inhibitorischen Neurotransmittern (GABA, Glycin) beteiligt (Vanegas und Schaible 2000). Mäuse mit Mutationen im Gen für den Ca_v2.1 zeigten verminderte Sensibilität auf schmerzhafte Reize und weisen auf eine pronozizeptive Rolle des Kanals hin (Fukamoto et al. 2009). Der Ca_v2.2 (N-Typ) wird ebenfalls vor allem präsynaptisch von Neuronen der Spinalganglien gebildet, wo er unter anderem für die Freisetzung der Transmitter Glutamat, Substanz P und CGRP, aber auch GABA verantwortlich ist (Evans et al. 1996; Vanegas und Schaible 2000; Doan 2010). Deren Freisetzung ist im Rahmen von Entzündungen gesteigert und kann durch Blockade des Ca_v2.2 reduziert werden, was auf eine direkte Beteiligung an dem gesteigerten Schmerzempfinden hinweist (Doan 2010). Spannungsabhängige Calcium-Kanäle vom N-Typ und deren Modulierbarkeit im Rahmen von Entzündungen sind bislang am intensivsten untersucht worden. So konnte gezeigt werden, dass es durch die Proteinkinase C, aktiviert durch inflammatorische Mediatoren wie Bradykinin (siehe Abbildung 12), zur Phosphorylierung des Ca_v2.2 an den Aminosäuren T(Threonin)422 und T425 und damit zu einer gesteigerten Kanal-Aktivität und Transmitterausschüttung kommt (Bhawe und Gereau 2004). Auch über den

Proteinkinase A (PKA) Signalweg, zum Beispiel induziert durch PGE_2 , kann es zur Phosphorylierung von N-Typ Calcium-Kanälen und damit zu einem gesteigerten Calcium-Ionenstrom und einer verstärkten Transmitterausschüttung kommen (Bhave und Gereau 2004; Nicol et al. 1992). Nach der Entdeckung der Gabapentinoide zur Behandlung von neuropathischem Schmerz (siehe Abschnitt 2.4.) trat vor allem die $\alpha_2\delta$ -1 Untereinheit in den Fokus der Untersuchungen. Hierbei wurde herausgefunden, dass diese in Tiermodellen zum neuropathischen Schmerz verstärkt exprimiert wird. Durch *in situ*-Hybridisierung wurde gezeigt, dass sowohl die Anzahl der exprimierenden Neurone, als auch die Signalintensität in diesen nach partiellen Nervenschädigungen um ein vielfaches ansteigt, während die α_1 und β Untereinheiten nicht beeinflusst werden (Newton et al. 2001; Luo et al. 2001). Außerdem zeigten Luo et al., dass diese Hochregulation auf mRNA Ebene, also transkriptional, vonstattengeht und von entscheidender Bedeutung für mechanische Allodynie ist (Luo et al. 2001, 2002).

2.3. Von akutem zu neuropathischem Schmerz

Die oben genannten Abläufe beziehen sich weitestgehend auf das akute Schmerzempfinden und haben pathophysiologisch die Aufgabe den Körper zu schützen. Dies geschieht sowohl durch die Detektion noxischer Reize (Abschnitt 1), als auch durch die Sensibilisierung von Neuronen auf Schmerzreize im Rahmen von Entzündungen und Verletzungen, um entsprechende Regionen besonders zu schonen (Abschnitt 2). Diese Vorgänge haben für die Dauer des Geschehens eine schützende Wirkung und sind nach dem Abklingen der Entzündung bzw. dem Ausheilen einer Verletzung reversibel (Woolf und Mannion 1999). Bleiben Schmerz und Überempfindlichkeit dennoch bestehen, entwickelt sich der Schmerz vom Krankheitssymptom zur Krankheit selbst und wird als pathologischer oder neuropathischer Schmerz bezeichnet (Dinakar und Stillman 2016). Patienten empfinden dabei sowohl stimulus-unabhängige, spontane Schmerzen, als auch die zuvor beschriebenen Symptome der Überempfindlichkeit auf noxische und nicht-noxische Reize (Hyperalgesie und Allodynie). Die hierfür verantwortlichen pathophysiologischen Mechanismen können sehr unterschiedlich und komplex und die Gründe vielfältig sein. Diese reichen von traumatischen über toxische, infektiöse und immun-medierte bis hin zu metabolischen und Medikamenten-induzierten Ursachen

(Woolf und Mannion 1999). Zudem können Veränderungen in jedem Abschnitt der schmerzvermittelnden Signalwege zu persistierendem Schmerz führen. Es können also zu Veränderungen im peripheren, zum anderen auch im zentralen Nervensystem, sowohl im aufsteigenden, als auch im absteigenden Teil, sowie in der komplexen sehr individuellen emotionalen Empfindung von Schmerzen dazu führen, dass Schmerzen ohne entsprechende noxische Reize wahrgenommen werden. Es lassen sich folglich ganz grundsätzlich periphere und zentrale Mechanismen unterscheiden, wobei sich im Folgenden auf die peripheren Mechanismen beschränkt werden soll. Ausgangspunkt für neuropathischen Schmerz ist in der Regel eine Schädigung des Nerven und die damit verbundene Sensibilisierung durch Neuromodulatoren (siehe Abschnitt 2.2.). Was genau für den anschließend anhaltenden Schmerz verantwortlich ist, ist bis heute nicht geklärt. Die ursprüngliche Entzündung in der Peripherie bildet sich zurück und die dort vor allem von Immunzellen freigesetzten Neuromodulatoren spielen dann nur noch eine untergeordnete Rolle. Auch die von ihnen induzierten, kurz andauernden post-translationalen Mechanismen werden wieder inaktiv. Bei andauerndem neuropathischem Schmerz kommt es vielmehr zu einer strukturellen und funktionellen Umstrukturierung des Neurons durch Veränderungen in der Genexpression von Neuromodulatoren, Ionenkanälen, G-Protein gekoppelten Rezeptoren und Strukturproteinen (Dinakar und Stillman 2016). Für den anhaltenden Effekt spielen auch die durch die Sensibilisierung des Nerven aktivierten peripheren Gliazellen (Schwann-Zellen & Satellitenglia-Zellen) und ortsständigen Makrophagen entlang des Axons und in den Spinalganglien eine Rolle. Diese können durch die Bildung von Zytokinen (TNF α und IL-6) und anderen Modulatoren primäre sensorische Neurone auch nach dem Abklingen der Entzündung am ursprünglichen Ort des Geschehens weiterhin beeinflussen. Insgesamt gibt es vielfältige Überschneidungen zwischen inflammatorischem und neuropathischem Schmerz und die genauen Ursachen, die zum Persistieren des Schmerzes führen, sind nach wie vor ungeklärt.

2.4. Therapieansätze zur Behandlung von inflammatorischem und neuropathischem Schmerz

Die in Abschnitt 1 und 2 beschriebenen peripheren sowie auch die zahlreichen zentralnervösen Mechanismen bieten vielfältige Ansatzmöglichkeiten für eine medikamentelle Therapie von Schmerzen sowie verstärktem Schmerzempfinden im Zuge von inflammatorischem und neuropathischem Schmerz. Gleichzeitig stellt aber eben diese Komplexität eine Schwierigkeit für die pharmazeutische Industrie dar, da es nicht einen konkreten Angriffspunkt gibt, sondern viele Mechanismen ineinander greifen.

Die naheliegendste Option wäre, den Schmerz-detektierenden Kanal direkt durch einen Antagonisten zu blockieren. An solchen direkten TRPV1 Antagonisten wird nach wie vor intensiv geforscht, allerdings stellt zum einen die Polymodalität des Rezeptors, also das unterschiedliche Ansprechen auf diverse noxische Reize (Agonisten, thermische Reize, pH-Veränderungen) ein Problem dar. Zum anderen zeigten Antagonisten des TRPV1 zum Teil thermoregulatorische Nebenwirkungen (siehe Abschnitt 1.1.1.) (Roberts und Connor 2006; Jara-Oseguera et al. 2008). Da Capsaicin, als direkter TRPV1 Agonist, eine desensibilisierende Wirkung hat, ist auch der Einsatz von Capsaicin und -Analoga vielfach untersucht worden und aktuell befindet sich in Deutschland ein transdermales Präparat in Form eines Pflasters (Qutenza®) auf dem Markt (EB 2010; Knotkova et al. 2008). Der Nachteil liegt allerdings in dessen initial schmerzauslösender Wirkung, bevor es anschließend durch die Desensibilisierung zum mehrere Wochen anhaltenden, reduzierten Schmerzempfinden kommt (Roberts und Connor 2006).

Einen weiteren denkbaren Angriffspunkt stellen die spannungsabhängigen Natrium-Kanäle dar. Hier liegt das größte Problem in dem nahezu ubiquitären Vorkommen von Natrium-Kanälen im Nervensystem und deren Bedeutung für die Weiterleitung von Aktionspotentialen jeglicher Art. Eine lokale Blockade von Natrium-Kanälen macht man sich in der Lokalanästhesie, zum Beispiel beim Einsatz von Lidocain, zu Nutze. Dabei geht jedoch nicht nur die Empfindung von noxischen Reizen verloren, sondern jede sensorische sowie auch motorische Aktivität des betäubten Nervs. Für einen sinnvollen Einsatz in der Schmerztherapie bedarf es für die Nozizeption spezifischer Kanäle. Hierbei ist in den letzten Jahren vor allem der $\text{Na}_v1.7$ in den Fokus der Untersuchungen gerückt, der spezifisch für periphere Neurone zu sein scheint. $\text{Na}_v1.7$ knockout Mäuse zeigten

einen Verlust von Schmerzempfinden, der auch bei Menschen mit einem solchen Gendefekt festgestellt wurde. Diese Beobachtungen machen den $\text{Na}_v1.7$ zu einem interessanten Angriffspunkt für Therapeutika, allerdings bedarf es hierfür weiterer Untersuchungen (Emery et al. 2016; Dib-Hajj et al. 2009; King und Vetter 2014).

Auch die in Abschnitt 2.2.4. beschriebenen Calcium-Kanäle stellen einen möglichen Angriffspunkt in der Schmerztherapie dar. Aus dem Gift der Kegelschnecke (*Conus magus*), dem Conotoxin, wurden verschiedene Isoformen synthetisiert, die sehr spezifisch für bestimmte Kanäle sein können. Zu den Calcium-Kanal Blockern gehört die Gruppe der ω -Conotoxine, die spezifisch Kanäle vom P/Q- und N-Typ blockieren. Als Medikament befindet sich derzeit Ziconotid (auch ω -Conotoxin MVIIA, Präparatname: Prialt©) auf dem Markt, was eine schmerzlindernde Wirkung bei akutem Schmerz aufweist. Zudem stellt es eine Alternative zum Einsatz von Opioiden dar, bei denen es bei lang anhaltender Therapie zu Toleranz und Abhängigkeit kommen kann (McGivern 2007; Schneider und Ruppen 2017). Eine weitere interessante Medikamentengruppe zur Behandlung chronischer Schmerzen bei Menschen und Tieren stellen die Gabapentinoide dar. Diese wurden ursprünglich als Strukturanaloga des inhibitorischen Neurotransmitters GABA (γ -Aminobuttersäure) synthetisiert, weisen aber keine Wirkung an GABA Rezeptoren auf, sondern wirken eher an spannungsabhängigen Calcium-Kanälen an der Präsynapse im Dorsalhorn des Rückenmarks (Hamann 2017). Hierbei binden sie vor allem an die $\alpha_2\delta$ -1 Untereinheit und inhibieren den Calcium-Einstrom an der Präsynapse und damit verbunden die Ausschüttung von Neurotransmittern (Field et al. 2006; Sutton et al. 2002; Sutton et al. 2003; Martin et al. 2002; Sarantopoulos et al. 2002; Cunningham et al. 2004). Neuere Studien weisen jedoch auf deutlich komplexere Wirkungsweisen hin. So wird ein Einfluss auf den intrazellulären Transport der $\alpha_2\delta$ -1 Untereinheit zur Membran hin („trafficking“) diskutiert (Hendrich et al. 2008; Bauer et al. 2009). Gabapentinoide scheinen außerdem einen Einfluss auf die Inflammation, im Sinne einer reduzierten Aktivierung von Mikroglia und damit geringeren Freisetzung von Zytokinen, zu haben (Wodarski et al. 2009; Kukkar et al. 2013). Eine antiinflammatorische Wirkung von Gabapentin konnte auch in anderen Zusammenhängen beobachtet werden. So zeigten Yamaguchi et al. einen solchen Effekt auf humane Glioblastoma Astrozytoma Zellen nach Substanz P Stimulation. Dabei beobachteten sie einen Einfluss auf die intrazellulären Signalwege über die p38 MAP Kinase sowie NF κ B (Yamaguchi et al. 2017). Anfuso et al. untersuchten Gabapentinoide im Zusammenhang mit okulären

Entzündungen und konnten auch hier eine Reduktion der LPS-induzierten Expression von inflammatorischen Mediatoren durch Gabapentin nachweisen (Anfuso et al. 2017). Die Wirkungen der Gabapentinoide scheinen also weitaus komplexer zu sein als anfangs angenommen und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Neben den genannten Ansätzen mit dem Ziel, die für die Reizwahrnehmung, -weiterleitung und -übertragung verantwortlichen Ionenkanäle pharmakologisch zu beeinflussen, spielen auch die inflammatorischen Mediatoren und deren Produktionswege eine wichtige Rolle als Angriffspunkt für Medikamente. Zu den am häufigsten als Schmerzmittel eingesetzten Medikamenten gehört die Gruppe der NSAID's (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*) mit ihren berühmtesten Vertretern Acetylsalicylsäure (Aspirin® u.a.), Diclofenac (Voltaren® u.a.) und Ibuprofen (Ibuflam® u.a.) (Hamza und Dionne 2009). Die Wirkung der meisten NSAID's beruht auf der Unterdrückung der Prostaglandin-Synthese auf Ebene des Enzyms Cyclooxygenase (COX). Von diesem Enzym gibt es im Körper zwei Isoformen. Die COX-1, die nicht induzierbar ist und vielfältige homöostatische Funktionen im Körper hat, und die COX-2, die durch inflammatorische Stimulation induzierbar ist und vor allem durch die Bildung von Prostaglandinen zur Immunantwort des Körpers beiträgt. Für den gewünschten antiinflammatorischen und analgetischen Effekt von NSAID's spielt also vor allem die Inhibition der COX-2 eine Rolle. Darum wurde sich vermehrt auf die Entwicklung COX-2 selektiver NSAID's konzentriert, wodurch sich unerwünschte Arzneimittelwirkungen durch Hemmung der COX-1 verhindern lassen (Samad und Abdi 2001). Die Wirkungen von NSAID's scheinen aber deutlich vielfältiger zu sein und sich nicht allein auf die Hemmung der COX zu beschränken (für einen Überblick siehe: Hamza und Dionne 2009). Zudem wurde inzwischen auch ein direkter inhibitorischer Effekt auf die Aktivierung von TRP-Kanälen (TRPA1 und TRPV1) entdeckt, der zu der analgetischen Wirkung der NSAID's beitragen könnte (Nozadze et al. 2016).

Neuere Ansätze in der Schmerztherapie befassen sich mit einer Blockade der Prostaglandin Rezeptoren (EP₁₋₄) (Kirkby Shaw et al. 2016). So erhielt im Januar 2018 das Medikament Grapiprant (Galliprant®) die Genehmigung für das Inverkehrbringen innerhalb der EU (European Medicines Agency 2018). Grapiprant ist ein EP₄-Rezeptor Antagonist. In Tiermodellen von inflammatorischem Schmerz zeigte es eine schnell einsetzende antinozizeptive Wirkung (De Vito et al. 2017). Zugelassen ist es für Hunde zur Behandlung von Schmerzen im Zuge einer Osteoarthritis.

Auch Anti-Zytokin Therapien werden für die Behandlung von inflammatorischem und auch neuropathischem Schmerz diskutiert (Schäfers und Sommer 2007; Palladino et al. 2003). Dabei geht es darum, entweder die Produktion und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (TNF α , IL-6, IL-1 β) oder deren Wirkung am jeweiligen Rezeptor zu blockieren. Insbesondere der langfristige Einsatz im Zusammenhang mit der Therapie von neuropathischem Schmerz ist jedoch aufgrund der vielfältigen Aufgaben der Zytokine im Organismus fraglich. Daher könnte ein weiterer Ansatz zur Behandlung darin liegen, nicht die proinflammatorischen Zytokine zu inhibieren, sondern das Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen hin zu den antiinflammatorischen (z.B. IL-10) zu verschieben (Schäfers und Sommer 2007). Für Interleukin-10 konnte dabei bereits gezeigt werden, dass es nach intrathecaler Injektion von IL-10 Plasmid DNA zu einer lang anhaltenden Reduktion von neuropathischem Schmerz kommt (Milligan et al. 2006).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass es für die Behandlung von inflammatorischem und neuropathischem Schmerz bislang keine Therapiemöglichkeiten ohne unerwünschte Nebeneffekte gibt. Dies liegt zum einen daran, dass es schwierig ist spezifische Kanäle im nozizeptiven System zu beeinflussen, ohne dabei auch auf andere zentralnervöse Strukturen einzuwirken. Zum anderen spielen viele inflammatorische Mediatoren und intrazelluläre Signalwege, die im Rahmen von neuropathischem und inflammatorischem Schmerz von Bedeutung sind, auch bei zahlreichen weiteren physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen eine Rolle und stellen damit kein optimales Ziel für pharmakologische Interventionen dar.

Es bedarf also auch weiterhin intensiver Forschung, um einerseits die Physiologie der Schmerz-Wahrnehmung und andererseits die pathophysiologischen Vorgänge im Zuge der Sensibilisierung nozizeptiver Neurone besser zu verstehen. Nur dann lassen sich auch neue mögliche Angriffspunkte für Therapeutika entdecken, um Schmerz besser als bislang behandeln zu können.

3. Zellkultur als Alternative zum Tierversuch

Im Rahmen der Projekte, deren Ergebnisse in dieser Doktorarbeit dokumentiert sind, wurden Zellkulturen als Alternative zum Tierversuch gewählt, um den Einfluss

somatosensorischer und inflammatorischer Stimuli auf einzelne Zellen, sowie den Einfluss bestimmter pharmakologisch interessanter Substanzen auf die inflammatorische Antwort zu untersuchen. Im Rahmen des 3R-Prinzips, welches 1959 von den britischen Wissenschaftlern Russel und Burch in dem Buch „The Principles of Humane Experimental Technique“ veröffentlicht wurde, gilt es Tierversuche so weit wie möglich zu ersetzen (**R**eplacement), die Anzahl an Versuchstieren zu minimieren (**R**educement) und notwendige Tierversuche zu optimieren (**R**efinement) (Liebsch et al. 2011). Dieses Prinzip fand mit der EU Richtlinie 2010/63/EU erstmals auch gesetzliche Anerkennung und wurde 2013 in dem novellierten Tierschutzgesetz und der Tierschutz-Versuchstier-Verordnung auch in deutsches Recht umgesetzt. Für die in den Abschnitten 1 und 2 genannten gewonnenen Erkenntnisse waren zum Teil Tierversuche, auch mit gentechnisch modifizierten Tieren, unausweichlich, um Funktionen einzelner Kanäle und Strukturen, sowie deren Rolle in dem komplexen Zusammenhang des Gesamtorganismus nachvollziehen zu können. Um allerdings auf dem bisherigen Wissen aufbauend detaillierter zelluläre und molekulare Mechanismen einzelner Zellen zu untersuchen, kann zum Teil auch mit Zellkulturen gearbeitet werden. Dabei lassen sich aus einem Tier mehrere Zellkulturen einer oder auch mehrerer Strukturen anlegen, welche nach unterschiedlicher Behandlung untersucht und verglichen werden können. Dadurch lässt sich die Anzahl an Versuchstieren deutlich reduzieren. Zur Untersuchung inflammatorischer Einflüsse auf Zellen neuroglialer Primärkulturen hat sich das Modell einer Lipopolysaccharid-Stimulation etabliert (Fuchs et al. 2013; Damm et al. 2017; Wuchert et al. 2008; Ott et al. 2010). Dabei können zum einen Effekte auf einzelne Zellen immunzytochemisch betrachtet werden, zum anderen lassen sich Veränderungen auf mRNA Ebene untersuchen (RT-PCR). Daneben besteht die Möglichkeit nach erfolgter Stimulation die Freisetzung bestimmter Botenstoffe in Überständen der Kulturen zu messen. Außerdem kann der Einfluss physikalischer (z.B. Temperatur) und chemischer (z.B. Neurotransmitter) Stimuli auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration untersucht werden, was auf die Aktivierung spezifischer Kanäle schließen lässt. Für die Projekte dieser Dissertationsschrift wurden bereits am Institut für Veterinär-Physiologie etablierte neurogliale Primärzellkulturen von Spinalganglien und dem *Nucleus preopticus medianus* (MnPO) der Ratte verwendet (Simm et al. 2016; Ott et al. 2015).

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1st Publication: Primary cultures from rat dorsal root ganglia: Responses of neurons and glial cells to somatosensory and inflammatory stimulation

Veröffentlicht in: Neuroscience, 2018; 394: 1-13

**Primary cultures from rat dorsal root ganglia: responses of neurons
and glial cells to somatosensory or inflammatory stimulation**

Stephan Leisengang¹, Daniela Ott¹, Jolanta Murgott¹, Rüdiger Gerstberger¹,
Christoph Rummel^{1,2}, Joachim Roth^{1,2}

¹Department of Veterinary-Physiology and -Biochemistry, Justus-Liebig University
Giessen,
Frankfurter Strasse 100, D-35392 Giessen, Germany

²Center for Mind, Brain and Behavior – CMBB, Philipps-Universität of Marburg &
Justus-Liebig-University of Giessen

Corresponding author:

Dr. Joachim Roth

Department of Veterinary-Physiology and -Biochemistry, Justus-Liebig-University
Giessen

Frankfurter Strasse 100, D-35392 Giessen, Germany

Phone: +49-641 - 99 - 38150

Fax: +49-641 - 99 - 38159

E-mail: joachim.roth@vetmed.uni-giessen.de

ABSTRACT

Primary cultures of rat dorsal root ganglia (DRG) consist of neurons, satellite glial cells and a moderate number of macrophages. Measurements of increased intracellular calcium $[Ca^{2+}]_i$ induced by stimuli, have revealed that about 70% of DRG neurons are capsaicin-responsive nociceptors, while 10% responded to cooling and or menthol (putative cold-sensors). Cultivation of DRG in the presence of a moderate dose of lipopolysaccharide (LPS, 1 $\mu\text{g/ml}$) enhanced capsaicin-induced Ca^{2+} -signals. We therefore investigated further properties of DRG primary cultures stimulated with 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS for a short period. Exposure to LPS for 2 h resulted in pronounced release of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) into the supernatants of DRG cultures, increased expression of both cytokines in the DRG cells and increased TNF immunoreactivity predominantly in macrophages. We further observed an accumulation of the inflammatory transcription factors NF-IL6 and STAT3 in the nuclei of LPS-exposed DRG neurons and macrophages. In the presence of the cytotoxic agent cisplatin (5 or 10 $\mu\text{g/ml}$), the number of macrophages was decreased significantly, the growth of satellite glial cells was markedly suppressed, but the vitality and stimulus-induced Ca^{2+} -signals of DRG neurons were not impaired. Under these conditions the LPS-induced production and expression of TNF- α and IL-6 were blunted. Our data suggest a potential role for macrophages and satellite glial cells in the initiation of inflammatory processes that develop in sensory ganglia upon injury or exposure to pathogens.

Key words: dorsal root ganglia; sensory neurons; satellite glial cells; lipopolysaccharide; cytokines; inflammation; cisplatin; Ca^{2+} -imaging;

INTRODUCTION

Dissociated sensory neurons from rat dorsal root ganglia (DRG) can be cultured and investigated *in vitro* since they maintain features and molecules of sensory nerve endings, which respond to various chemical or physical stimuli under *in vivo* conditions (Malin et al. 2007). For example, short term cultures from DRG have been used to study the properties of ion channels of the TRP (transient receptor potential) family, including the pain sensor TRPV1 or the cold sensor TRPM8 (Caterina et al. 2000; Peier et al. 2002). These channels respond to capsaicin / noxious heat or to menthol / cold with a transient rise in intracellular Ca^{2+} -concentrations $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Thus measurement of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is a standard method to investigate responses of TRP-channels to various types of activating stimuli (Tan & McNaughton 2016).

Systemic inflammation affects the thermoafferent and nociceptive systems (Cairns et al. 2014; Roth and Blatteis 2014; Walker et al. 2013; Watkins et al. 1995). Interactions between cold-sensitive thermoreceptors and inflammation, at the cellular level of the DRG are due to functional co-expression of TRPM8 with receptors for various mediators of inflammation, such as PGE_2 (Linte et al. 2007; Ott et al. 2015). There is also evidence supporting a marked effect of inflammation on TRPV1-positive nociceptive DRG neurons (Hensellek et al. 2007; Russel et al. 2009; Araldi et al. 2013; Hutchinson et al. 2013). With regard to the effect of inflammation on DRG, it has to be considered that neurons in sensory ganglia are surrounded by a single layer of satellite glial cells (Hanani 2005; Ohara et al. 2009). Primary cultures of DRG also contain satellite glial cells (Ott et al. 2015) which start growing again after dissociation and cultivation of the cells. Results obtained from studies in which mice have been injected with lipopolysaccharide (LPS) have shown a significant contribution of satellite glial cells to functional changes of DRG due to systemic inflammation (Blum et al. 2014; Blum et al. 2017). In addition, cells of the macrophage-monocyte lineage are also present in DRG (Li et al. 2004). These macrophages are resident and express the cellular marker ED1 (Hu & McLachlan 2003). Upon spinal nerve transections, blood ED1-positive macrophages were noted to infiltrate the DRG (Dubovy et al. 2007). The expression of various Toll-like receptors on macrophages (Kielian 2006) and recently also on satellite glial cells (Mitterreiter et al. 2017) has highlighted that these cells may also be targets for pathogenic or endogenous

molecules, i.e. pathogen associated molecular patterns (PAMPs) or damage associated molecular patterns (DAMPs) (Gadani et al. 2015).

In contrast to the well established use of primary cultures of DRG to study properties of nociceptive or thermoreceptive neurons (Caterina et al. 2000; Bautista et al. 2007), there has been limited use of primary cultures of DRG to investigate the contributions of glial elements to the inflammation-related changes in neurons within DRG. Using LPS as a stimulus to mimic conditions of systemic inflammation, we hypothesized that responses of nociceptive neurons are enhanced in LPS-treated DRG cultures. We further hypothesized that glial elements within the DRG primary cultures are a major target for LPS and represent the source of inflammatory mediators in the primary cultures. Finally we expected that removal of the glial elements from the DRG cultures might abolish the inflammatory induced changes in neuronal responses. The major outcomes of the experiments reported here can be summarized as follows. The responsiveness of nociceptive neurons was enhanced in the presence of a moderate dose of LPS in the cultivation medium. Using doses of the chemotherapeutic drug cisplatin, which reduced numbers of macrophages and the growth of satellite glial cells, without impairing vitality of neurons (Jiang et al. 2008), we provide evidence for a critical role of glial elements in the LPS-induced production of inflammatory mediators within DRG primary cultures. Furthermore, we also identify the contribution of inflammatory mediators to the enhanced responses of neurons to nociceptive stimulation. Our data are discussed in the context of potential communication between glial cells and neurons in DRG during conditions of systemic inflammation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Preparation and cultivation of DRG cells

Wistar rats (4-6 weeks old) from an in-house breeding colony were used for all experiments. Parent animals were obtained from Charles River WIGA (Sulzfeld, Germany). Animal care, breeding and experimental procedures were conducted according to the guidelines approved by the Hessian Ethical Committee (approval

numbers GI 468_M and GI 487_M). Room temperature was maintained at 22 ± 1 °C and a relative humidity of 50%. Artificial lights were on from 7:00 AM to 7:00 PM.

DRG primary cultures were prepared as previously described (Ott et al. 2015). Rats were killed by cervical dislocation and the spinal column was opened. Up to 18 DRG along the vertebral column were removed under aseptic conditions and put into Petri dishes filled with cold, oxygenated GBSS (Gey's Balanced Salt Solution; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) supplemented with 0.5% D-glucose (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany). Freshly prepared DRG were then transferred into oxygenated HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, without Ca^{2+} and Mg^{2+} ; Biochrom GmbH, Berlin, Germany) with 20 mM HEPES (Sigma Aldrich Chemie GmbH) at pH 7.4. The supernatant was removed and the DRG were enzymatically digested, dissociated, washed, re-suspended with a cell number of 75000 cells / ml. Cells were then cultured in Neurobasal A medium supplemented with 2% B27, penicillin (100 U/ml) / streptomycin (0.1 mg/ml) and 2 mM L-glutamine (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) on poly-L-lysine coated glass coverslips. After 18-24 hours, the cultures predominantly consisting of neurons (10%), satellite glial cells (80%) and macrophages (1%) were used for intracellular calcium measurements, for stimulation experiments with LPS, or for subsequent immunocytochemical investigations.

In one series of experiments, DRG cells were cultured after preparation for 18-24 hours in medium containing 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS. In several series of experiments, DRG cells were cultured in medium containing 5 or 10 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin, corresponding to 16 and 32 μM , respectively (Sigma Aldrich Chemie GmbH). Controls from the same preparations were cultured in medium without LPS or cisplatin. The doses of LPS and cisplatin were chosen according to pilot experiments and to published data showing that cisplatin doses below 50 μM did not significantly reduce the survival of DRG neurons (Jiang et al. 2008). The survival of DRG neurons was quantified using the trypan blue exclusion assay (Jiang et al. 2008). The effects of cisplatin treatment on the growth of satellite glial cells was visualized by immunocytochemical staining with GFAP antibodies (see section 2.5). The numbers of macrophages were counted after immunocytochemical staining with ED1 antibodies (see section 2.5). Neurons cultured for 18-24 hours in medium containing 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS were used for intracellular Ca^{2+} -measurements. DRG cultured for 18-24 hours in medium containing cisplatin were used for intracellular Ca^{2+} -measurements and

for LPS-stimulation experiments (see below). Finally, neurons cultured for 18-24 hours in medium containing LPS and cisplatin were used for intracellular Ca^{2+} -measurements.

Measurement of intracellular calcium

Measurements of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were performed at 37 °C as previously described (Ott et al. 2015; Simm et al. 2016). Cells from DRG primary cultures were loaded for 45 min with 2 μM fura-2-AM (Life Technologies GmbH) in complete medium for 45 min in a humidified atmosphere of 5% CO_2 / 95% air at 37 °C. The coverslips were placed under an inverted microscope (IMT-2; Olympus GmbH, Hamburg, Germany) in a specially constructed Teflon® culture chamber and superfused with Ca^{2+} -imaging buffer (pH 7.4 with a flow rate of 2.0 ml/min; see: Ott et al. 2015). Using a filterwheel-based excitation system, fluorescence values were recorded and analyzed (MetaFluor 7.7.8.0 software, Visitron GmbH, Puchheim, Germany). Regions of interest were defined for single cells by a continuously variable aperture. Emitted fluorescence (>515 nm) was recorded over time using a Spot Pursuit digital CCD-camera (Model 23.0, Visitron GmbH) after alternating excitations at 340 and 380 nm. The 340 / 380 ratios proportional to $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were computed and analyzed. Drugs used for stimulation of DRG cells were stored as stock solutions at -20 °C. [menthol (Sigma Aldrich Chemie GmbH; 100 mM in ethanol), capsaicin (Sigma Aldrich Chemie GmbH; 10 mM in DMSO), PGE_2 (Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Germany; 1 mM in Ca^{2+} -imaging buffer), histamine (Sigma Aldrich Chemie GmbH; 100 mM in Ca^{2+} -imaging buffer), or buffer containing “high potassium concentration” (50 mM KCl)]. For the experiments they were diluted just prior to experimentation in Ca^{2+} -imaging buffer to their working dilutions of 100 μM menthol, 1 μM capsaicin, 10 μM PGE_2 , 1 mM histamine. The doses were chosen according to preliminary recordings from pilot studies, in which several doses were tested. Drugs were applied to the recording chamber via superfusion at 2.0 ml/min for 180 seconds. In each experiment we tested 3-4 distinct stimuli. When capsaicin was included as a stimulus, it was administered at the end of a given experiment since DRG neurons show signs of desensitization or even degeneration in response to capsaicin (Caterina & Julius 2001; Passmore 2005).

Short-term stimulation with LPS and cytokine measurements

After cultivating the cells for 18-24 h they were incubated with LPS (10 µg/ml or 100 µg/ml; Sigma Aldrich Chemie GmbH) or solvent in complete medium for 120 min in a humidified atmosphere of 5% CO₂ / 95% air at 37 °C. After incubation the supernatants were removed from the cells, transferred and stored at -45 °C for later determination of cytokines. Cells were used for immunocytochemistry and RT-PCR (see below). TNF-α and IL-6 were measured in the supernatants of DRG primary cultures by highly sensitive bioassays, which detect even low concentrations of both cytokines. The cytotoxic effect of TNF-α on the mouse fibrosarcoma cell line WEHI 164 subclone 13 and the dose-dependent growth stimulation of IL-6 on the B9 hybridoma cell line were used as read-out in the bioassays. A murine TNF-α standard (code 88/532; National Institute for Biological Standards and Control, South Mimms, UK) and a human IL-6 standard (code 89/548; National Institute of Standards and Control, South Mimms, UK) were used to calibrate the assays (Ott et al. 2010; Soares et al. 2013; Simm et al. 2016).

Real-time PCR

Expression of selected inflammatory target genes was determined in 3 independent experiments. In each of these experiments, 16 wells with DRG cells cultured on poly-L-lysine coated glass coverslips were prepared as described above. Wells were stimulated with 10 µg/ml LPS (n = 8) or phosphate buffered saline (n = 8) (PBS; Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfer Grund, Germany) for 2 h. After washing twice with PBS the cells were lysed in 200 µl RA1-buffer, which is a component of the NucleoSpin^R RNA XS Kit (Macherey Nagel, Düren, Germany). RNA extraction was carried out according to the protocol provided by the manufacturer. Reverse transcription of about 200 ng total RNA was performed by use of 50 U murine leukemia virus reverse transcriptase, 50 µM random hexamers, and 10 mM deoxynucleoside triphosphates (dNTP) mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), in a reaction volume of 20 µl. Thereafter relative quantification by real-time PCR was performed in duplicate using a primer/probe mixture (TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and a TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). We used the following cycling protocol: polymerase activation, 50 °C for 2 minutes, denaturation, 95 °C for 10

minutes and 40 cycles of 15 seconds denaturation at 95 °C, 1 minute of annealing and elongation at 60 °C.

We normalized the cDNA quantities using the housekeeping gene β actin (4352340E, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as a reference (Harden et al. 2014; Schweighöfer et al. 2016). The $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ method was used for quantification. The sample values for each gene correspond to x-fold difference from a control sample, which was given a designated value of 1 within the same experiment. For PCR-analysis we used the following gene expression assays from Applied Biosystems:

NF-IL6, Rn00824635_s1; SOCS3, Rn00585674_s1; IL-6, Rn01410330_m1; TNF- α , Rn99999017_m1; COX2, Rn00568225_m1; mPGES1 Rn00572047ml.

Immunocytochemistry

The following polyclonal antisera or monoclonal antibodies directed against cell-specific marker proteins were used for phenotypic identification of DRG cells: glial fibrillary acidic protein for satellite glial cells (rabbit anti-GFAP; DAKO GmbH, Hamburg, Germany; mouse anti-GFAP; Merck, Darmstadt, Germany), MAP2a+b for neurons (mouse AP-20 anti MAP2a+b; Sigma Aldrich Chemie GmbH), ED1 for macrophages (mouse anti rat-ED1; AbD Serotec, Oxford, UK). Cells were fixed with 4% freshly prepared paraformaldehyde in PBS (Sigma Aldrich Chemie GmbH), pH 7.4, for 15 min. The fixed cells were rinsed three times in PBS, followed by a 120 min incubation in blocking buffer containing 10% FCS (Capricorn Scientific GmbH) diluted in PBS-T containing 0.05% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Thereafter cells were incubated with the primary antibodies diluted in blocking buffer (anti-GFAP 1:1000, anti-MAP2a+b 1:600, anti-ED1 1:1000) for 48 h at 4 °C in a humidified chamber. Cells were washed three times with PBS to remove unbound antibodies. Thereafter, cells were incubated with fluorophore-coupled secondary antisera Alexa 488 donkey anti-rabbit IgG (H+L) (Life Technologies GmbH) and Cy3 goat anti-mouse IgG (H+L) (Dianova GmbH, Hamburg, Germany) at 1:500 or 1:2000 dilutions in blocking buffer for 2 h. Finally, the coverslips were embedded with a glycerol/PBS solution (Citifluor Ltd., London, UK). Cellular nuclei were stained with 2-(4-amidinophenyl)-1H-indole-6-carboxyamidine (DAPI; Life Technologies GmbH) for 8 min (Soares et al. 2013, Soares et al. 2017 for further details).

DRG cells subjected to short-time LPS treatment (10 µg/ml in medium, Sigma Aldrich) or to the medium without LPS for 2 or 4 h were immunocytochemically investigated with regard to TNF- α -expression or nuclear STAT3 or NF-IL6-immunoreactivities (Ott et al. 2010; Fuchs et al. 2013; Damm et al. 2017). For this purpose, we employed polyclonal antisera specific for rat TNF- α (goat anti-TNF- α , 1:200, R&D Systems, Wiesbaden, Germany), STAT3 (goat anti STAT3, 1:6000, Santa Cruz, CA, USA), or NF-IL6 (rabbit anti NF-IL6, 1:2000, Santa Cruz, CA, USA). Incubation with the fluorophore-coupled secondary antisera (Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG, 1:500, Life Technologies; Cy3 conjugated donkey anti-rabbit IgG, 1:2000, Dianova) and nuclear staining were performed as described above. Cells from DRG primary cultures were examined and photographed with a fluorescence microscope (Olympus Optical) equipped with the appropriate filter sets. Using the MetaMorph microscopic imaging software (Molecular Devices, San Jose, USA) we quantified the intensity of one of the three color channels (here: the red channel), which represented nuclear NF-IL6 and STAT3 signals. The average intensities of the signals within the active regions of interest (here: cell nuclei) were expressed as grey values. We always compared cell nuclei from PBS- or LPS-treated cells, which had been stained within the same immunocytochemical procedure.

Evaluation and statistics

In Ca²⁺-imaging experiments we expressed the numbers of neurons of a given group, responsive to a defined stimulus, as a percentage (%) of all neurons investigated. Stimulus-induced Ca²⁺-transients were expressed as the difference between resting [Ca²⁺]_i measured prior to the respective stimulation and the stimulus-induced [Ca²⁺]_i peak (Δ ratio [340/380 nm]). We considered a difference in Δ ratio [340/380 nm] of more than 0.05 to be a stimulus-induced Ca²⁺-signal. This procedure can be regarded as a strict exclusion criterion. The Δ ratio values, concentrations of cytokines in the supernatants of DRG primary cultures, relative expressions of inflammatory mediators, cell numbers, or intensities of nuclear signals of transcription factors were presented as means \pm standard error of the mean (SEM) and compared by an analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls multiple comparisons test. The calculations were carried out using the software package GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., LaJolla, CA, USA).

RESULTS

Responses of DRG primary cultures to neurochemical or thermal stimulation

In the first experiment we identified the populations of DRG neurons, which responded to capsaicin, menthol, PGE₂ or to rapid cooling or warming with an increase of $[Ca^{2+}]_i$ (Figure 1). 317 out of the 423 neurons investigated (almost 75%, predominantly neurons of small size) responded to the TRPV1 agonist capsaicin with pronounced Ca^{2+} -signals (Figure 1A). In some experiments, we also tested the effects of rapid warming from 36 °C to 45 °C. All neurons, which showed Ca^{2+} -signals in response to warming, also responded to capsaicin, meaning that the cells were putative nociceptors rather than warm-sensors (Figure 1A). In about 10% of all tested DRG neurons (42 out of 426 neurons), there was an increase of $[Ca^{2+}]_i$ after stimulation with the TRPM8 agonist menthol (Figure 1B). Most of these neurons belonged to the medium-sized group. A portion of menthol-responsive neurons were also activated by rapid cooling from 36 °C to 25 °C (Figure 1C). A moderate number of putative cold-sensors as well as nociceptors, about 4% of all neurons investigated (19 out of 426), also responded to PGE₂ with an increase $[Ca^{2+}]_i$ (Figure 1C).

In one series of experiments primary cultures from rat DRG were cultured after preparation in medium containing 1 µg/ml LPS or an equivalent volume of PBS. In these experiments we tested neuronal Ca^{2+} -transients in response to rapid warming, PGE₂, KCl and capsaicin (Figure 2). After cultivation for 18-24 hours, the presence of LPS in the medium caused an accumulation of TNF- α and IL-6 in the supernatants. Levels of both cytokines were significantly higher compared to cells cultured in medium only (TNF- α : 638 ± 73 versus 46 ± 4 ; IL-6: 469 ± 75 versus 5; N = 18, p < 0.001, for both cytokines). A consequence of the cultivation in the LPS-induced inflammation was an enhanced responsiveness of neurons to stimulation with capsaicin, the TRPV1 agonist. The strength of capsaicin-induced Ca^{2+} -signals was significantly enhanced and the percentage of neurons responding to rapid warming increased from 33% to 45%, indicating a sensitization of putative nociceptors by the inflammatory conditions (Figure 2).

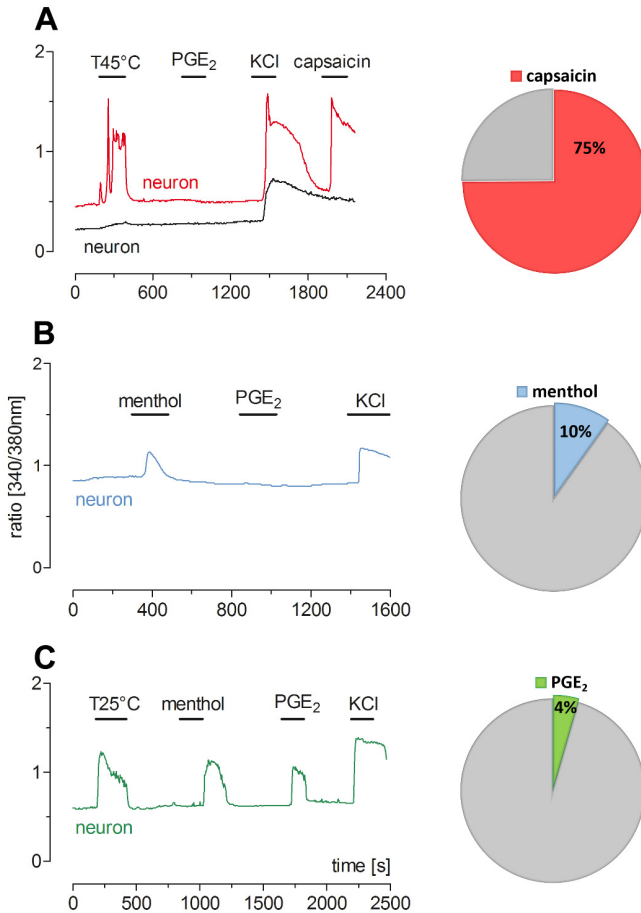


Figure 1: Populations of neurons from rat DRG primary cultures directly respond to capsaicin, menthol, or PGE₂ with an increase of [Ca²⁺]_i

A-C: Examples of intracellular calcium tracing recorded from neurons of a primary DRG culture illustrating the responsiveness to rapid warming (A) or cooling (C) or to the chemical stimuli capsaicin (A), menthol (B), or PGE₂ (C). Superfusion with buffer containing a high concentration of KCl (50 mM) served as vitality test for neurons. All neurons responded to the depolarizing stimulus KCl. On the right the percentages of neurons responding to the TRPV1-agonist capsaicin, to the TRPM8-agonist menthol, or to PGE₂ are illustrated.

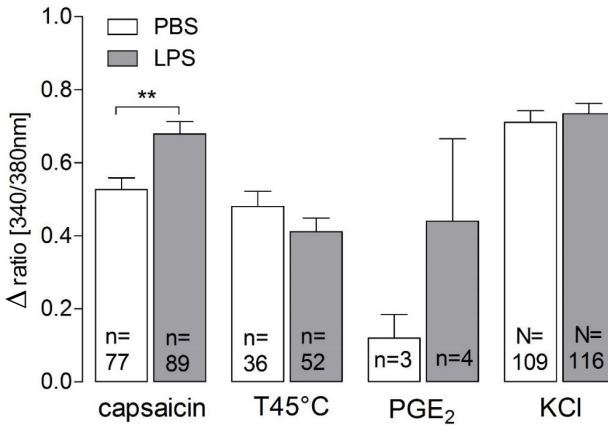


Figure 2: The strength of capsaicin-induced Ca^{2+} -signals in neurons from DRG primary cultures in presence of LPS / cytokines

After 24 h of cultivation in presence of PBS (control), or 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS, DRG primary cultures were employed for Ca^{2+} -imaging experiments. Δratio [340/380 nm] fluorescence values served as measure of intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Columns represent means \pm SEM of those cells, in which a given stimulus (capsaicin, rapid warming, PGE_2 or KCl) induced an increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in neurons of DRG primary cultures. In neurons cultured in medium containing 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS, the strength of the capsaicin-induced Ca^{2+} -signals was significantly higher compared to controls [N = numbers of tested neurons ; n = numbers of neurons responding to a given stimulus ; **: $p < 0.01$].

Responses of DRG primary cultures to short-term inflammatory stimulation with LPS

In the first experiment we tested the release of bioactive $\text{TNF-}\alpha$ and IL-6 into the supernatants of DRG primary cultures, which were stimulated with a short-term exposure to LPS. Cells were incubated for 2 h with 100 $\mu\text{g/ml}$ LPS, 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS or PBS as control. LPS caused a dose-dependent and significant elevation of $\text{TNF-}\alpha$ and IL-6 in the supernatants of DRG primary cultures when compared to PBS-treated controls (Figure 3). Since the lower dose of LPS already had a significant effect on the synthesis and release of $\text{TNF-}\alpha$ and IL-6, all further experiments and measurements were performed with 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS.

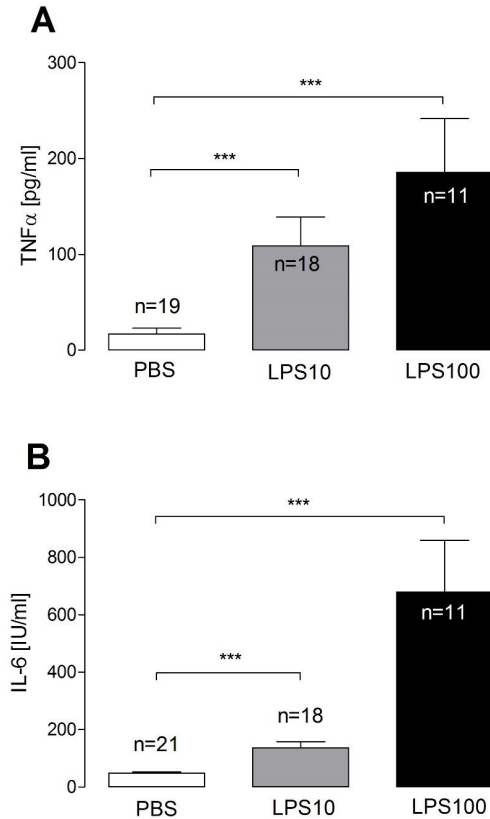


Figure 3: TNF- α and IL-6 concentrations in supernatants of rat DRG primary cultures in response to short-term stimulation with LPS

After 24 h of cultivation on poly-L-lysine coated glass coverslips, DRG primary cultures were incubated for 120 min with fresh medium containing PBS (control) or LPS (10 $\mu\text{g/ml}$ or 100 $\mu\text{g/ml}$). Columns represent means with SEM. At both tested doses, LPS caused a significant increase of TNF- α and IL-6 concentrations in the supernatants of DRG primary cultures [***: significant difference *versus* control; $p < 0.001$].

In the next experiment we analyzed the expression of some relevant inflammatory target genes, i.e. cytokines (TNF- α , IL-6), enzymes involved in inflammation-induced prostaglandin-synthesis (COX-2, mPGES-1) and transcription factors (NF-IL6, SOCS3) using RT-PCR. In line with the measurements of bioactive TNF- α and IL-6 in the supernatants, we detected a significant increase of the expression of both cytokines in cells collected from LPS-stimulated DRG primary cultures (Figure 4A, B). The expression of COX-2 was also elevated in LPS-treated DRG cells compared to controls, although just not quite statistically significant ($p = 0,0508$; Figure 4E). Expressions of mPGES-1, NF-IL6 and SOCS3 were almost identical in LPS- *versus* PBS-treated DRG cells.

To determine the cellular phenotypes, which might account for the increased expression and release of cytokines (i.e. TNF- α) in LPS-stimulated DRG primary cultures, TNF- α immunocytochemistry was combined with immunostaining of marker proteins for neurons, satellite glial cells or macrophages. Stimulation with LPS for 2 h resulted in pronounced TNF- α immune-labelling in ED1 positive macrophages, which seemed to be localized in the perinuclear Golgi complex and vesicular organelles in the cytoplasm (Figure 5; see also: Wuchert et al. 2008). Immunoreactive TNF- α was not detected in neurons and barely detected in GFAP-positive satellite glial cells. The lack of pronounced TNF- α immunoreactivity in cell-types distinct from macrophages does not exclude the participation namely of satellite glial cells in the LPS-induced production of TNF- α and other cytokines.

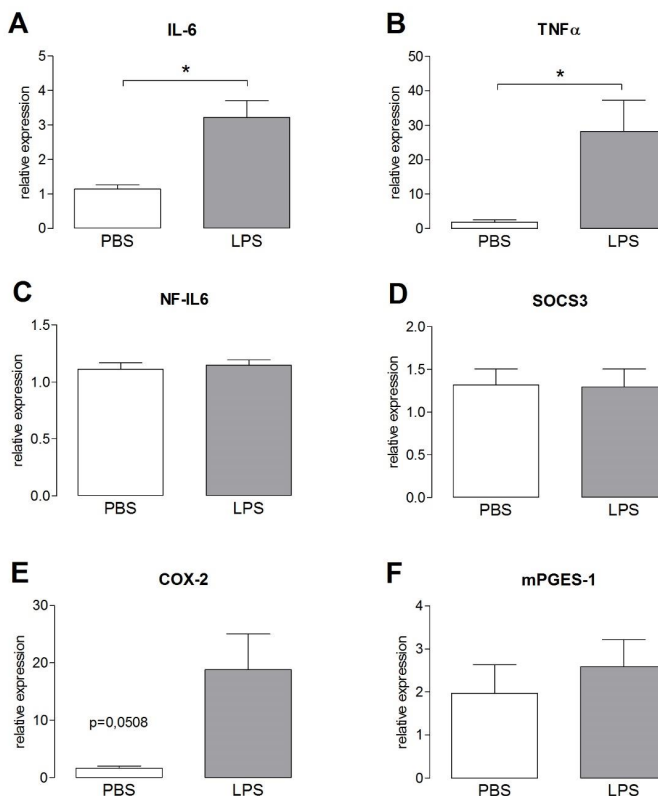


Figure 4: Expression of TNF- α and IL-6 is enhanced in rat DRG primary cultures in response to short-term stimulation with LPS

After 24 h of cultivation on poly-L-lysine coated glass coverslips, DRG primary cultures were incubated for 120 min with fresh medium containing PBS (control) or LPS (10 μ g/ml). Thereafter, the medium was removed, the cells were lysed, and RT-PCR was performed. Each column represents the mean of three independent experiments, in which expression of selected genes was determined in duplicates. LPS caused a significant increase of TNF- α and IL-6 expression in the cells of DRG primary cultures [*: significant difference *versus* control; $p < 0.05$]. There was a tendency for an increased expression of COX-2 in LPS-stimulated cells of DRG primary cultures.

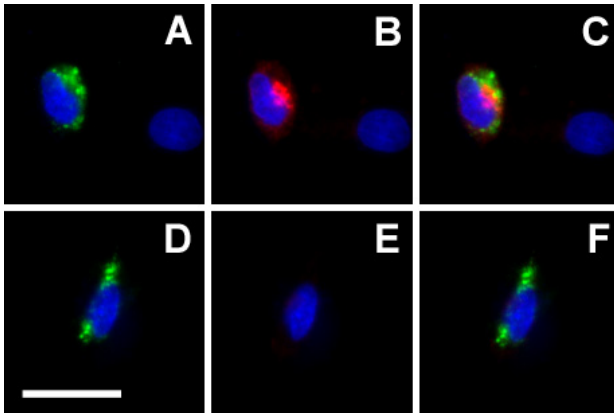


Figure 5: TNF- α immunoreactivity is induced predominantly in macrophages of rat DRG primary cultures in response to short-term stimulation with LPS

Employing a goat anti rat TNF- α antiserum, TNF- α immunoreactivity was detected in ED1-positive macrophages after 120 min stimulation of DRG primary cultures with medium containing 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS (A-C), while hardly any TNF- α immunoreactivity could be visualized in PBS-treated controls (D-F). Triple labelling for ED1 (in green; A, D), TNF- α (in red, B, E) and cellular nuclei by DAPI (in blue) allowed localization of TNF- α mainly to the perinuclear Golgi complex of LPS-treated ED1-positive cells (C), while there was no TNF- α immunoreactivity in controls (F). Scale bar = 12.5 μm .

A given inflammatory stimulus causes translocation of specific transcription factors into the nucleus of activated cells. NF κ B, STAT3 and NF-IL6 are important inflammatory transcription factors. Their accumulation in the nucleus can be visualized by immunocytochemistry, and thus these transcription factors serve as inflammatory activation markers (Rummel 2016). In our experiments, nuclear NF κ B-signals were hardly detectable in cells of DRG cultures, irrespective of the pre-treatment (LPS *versus* PBS) or the cellular phenotype. Nuclear STAT3 immunoreactivity was observed in neurons and satellite glial cells of PBS- and LPS-treated cultures. In neurons, nuclear STAT3 signals were stronger upon stimulation with LPS (Figure 6).

An effect of short-time stimulation with LPS was also observed for NF-IL6 immunoreactivity. LPS-stimulation caused a moderate increase of nuclear NF-IL6 translocation in neurons (Figure 7A, B, C) and a strong increase in macrophages (Figure 7D, E, F).

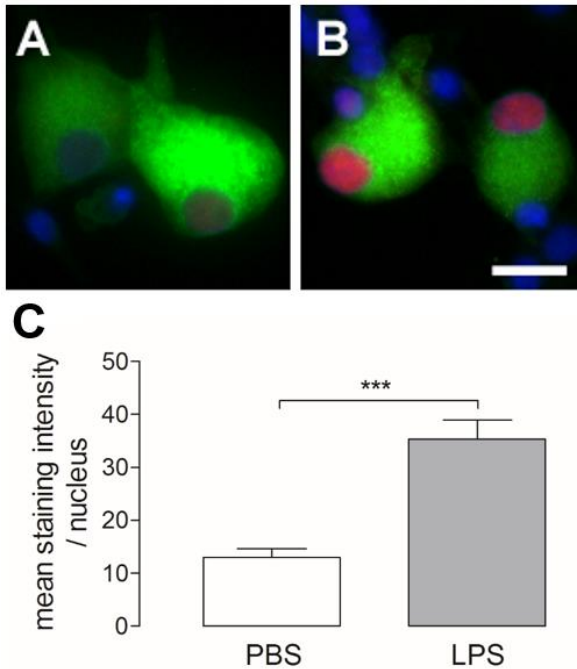


Figure 6: Nuclear STAT3 immunoreactivity is induced in neurons of rat DRG primary cultures in response to short-term stimulation with LPS

Employing a goat anti STAT3 antiserum, very low nuclear STAT3 immunoreactivity was detected in MAP2a+b positive neurons (A) under control conditions. Stimulation of DRG cultures with medium containing 10 µg/ml LPS for 2 hours resulted in increased STAT3 immunoreactivity in neurons (B). Triple labelling for MAP2a+b (A, B, in green), for STAT3 (A, B; in red) and cellular nuclei by DAPI (A, B in blue) allowed localization of STAT3 immunoreactivity in the nuclei of neurons (B). Scale bars = 12.5 µm. Photographed with a fluorescence microscope (Olympus Optical) equipped with the appropriate filter sets. The intensity of the red channel, which represented nuclei STAT3 signals was quantified with the Metamorph software. The average intensities of the signals within the active region of interest (here: cell nuclei) were expressed as grey values (C). The intensities measured in 91 neurons from LPS-stimulated cultures and 79 neurons from PBS-treated cultures derived from two independent preparations were compared [***: $p < 0.001$].

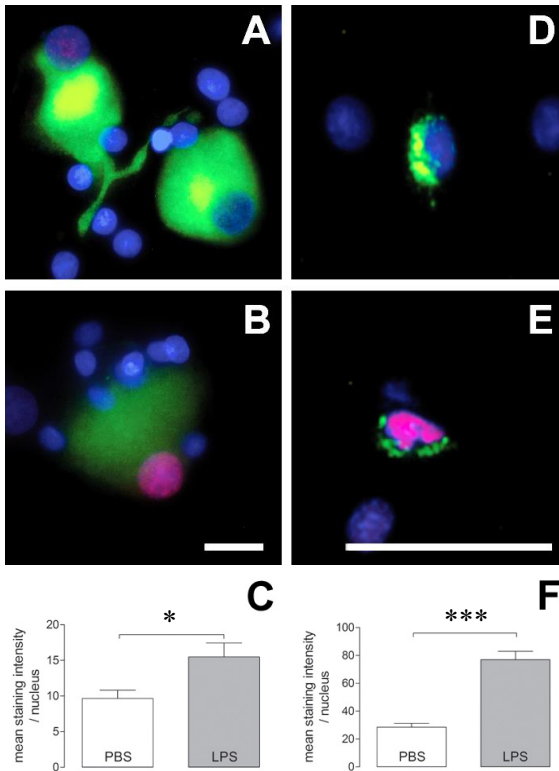


Figure 7:
Nuclear NF-IL6 immunoreactivity is induced in neurons and macrophages of rat DRG primary cultures in response to short-term stimulation with LPS

Employing a rabbit anti NF-IL6 antiserum, rather moderate nuclear NF-IL6 immunoreactivity was detected in MAP2a+b positive neurons (A, B) and ED1-positive macrophages (E) under control conditions. Stimulation of DRG cultures with medium containing 10 µg/ml LPS for 2 hours resulted in a moderate increase of NF-IL6 immunoreactivity in neurons (A, B) and in pronounced nuclear NF-IL6 signals in macrophages (E). Triple labelling for MAP2a+b (A, B) or ED1 (D, E; both in green), for NF-IL6 (A, B, D, E; in red) and cellular nuclei by DAPI (A, B, D, E in blue) allowed localization of NF-IL6 immunoreactivity in the nuclei of LPS-treated neurons (B) and microglial cells (E). Scale bars = 12.5 µm. The intensity of the red channel, which represented nuclear NF-IL6 signals was quantified with the Metamorph software. The average intensities of the signals within the active region of interest (here: cell nuclei) were expressed as grey values. The intensities measured in 65 neurons / 51 macrophages from LPS-stimulated cultures and 64 neurons / 52 macrophages from PBS-treated cultures derived from two (neurons) or three (macrophages) independent preparations were compared [*; $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$].

Effects of treatment with cisplatin on DRG primary cultures

DRG cells cultured for 18-24 h contain neurons (about 10%), satellite glial cells (about 80%) and macrophages (about 1%). Satellite glial cells, in particular, start to grow after placement of the cells on cover slips. As shown by staining the satellite glial cells with anti GFAP antibodies, they surround and cover the surface of neuronal cell bodies like under *in vivo* conditions (Figure 8A). Those cultured satellite glial cells, which did not cover the surface of neurons directly, formed pronounced cellular processes (Figure 8A). Cultivation of DRG cells with medium containing 5 or 10 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin strongly reduced GFAP immunoreactivity (i.e. the growth of satellite glial cells) and inhibited the formation of cellular processes (Figure 8B, C).

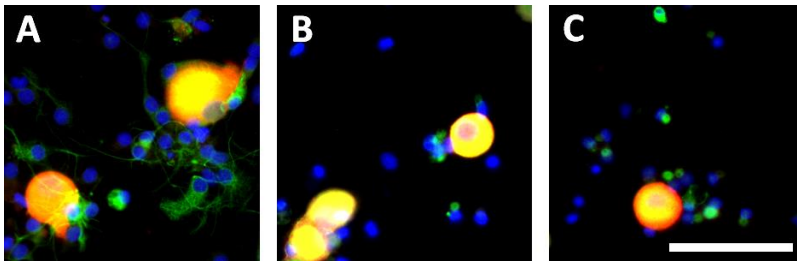


Figure 8: Cisplatin inhibits the growth of satellite glial cells in DRG primary cultures

A - C: Triple labeling for GFAP (green, marker for satellite glial cells), MAP2a+b (red, marker for neurons), and cellular nuclei (DAPI stain, blue) showed a strong reduction of the growth of satellite glial cells in presence of 5 or 10 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin in the culture medium after 24 h of cultivation (B, C). In controls (A) cultured without cisplatin, satellite glial cells not only surround neurons but also form pronounced cellular processes, when they grow distant from neurons. Scale bar = 50 μm .

The viability of neurons was not reduced by the chosen doses of cisplatin as shown by the trypan blue exclusion assay in 4 independent experiments (Figure 9A). The tendency for a reduced number of viable neurons by treatment with the higher dose of cisplatin was not significant. Due to the fact, that the number of ED1-positive macrophages was low in DRG primary cultures, it was possible to count these cells. Cultivation of DRG primary cultures with medium containing 5 or 10 µg/ml cisplatin caused a highly significant reduction of ED1-immunoreactive macrophages (Figure 9B).

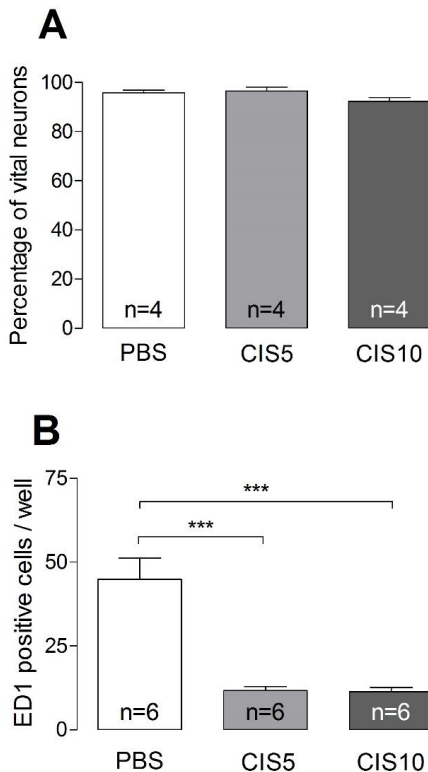


Figure 9:
Cisplatin does not impair vitality of neurons, but reduces the number of macrophages in DRG primary cultures

A: Using the trypan blue exclusion assay the percentage of vital neurons was determined. At the doses of 5 or 10 µg/ml, cisplatin did not reduce the numbers of vital neurons significantly.

B: ED1-positive microglial cells were counted after immunocytochemical staining. At both tested doses, cisplatin significantly reduced the numbers of ED1-positive cells in DRG primary cultures [***: significant difference *versus* control; $p < 0.001$].

Due to the attenuated growth of satellite glial cells and the reduced numbers of macrophages in DRG primary cultures (Figures 8, 9), we tested the effect of the presence of cisplatin in the culture medium on LPS-induced expression and release of bioactive cytokines into the supernatant. DRG cells cultured with medium containing 5 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin produced just 17% of the amount of $\text{TNF-}\alpha$ and 43% of IL-6, which we detected in the supernatants of the control cultures stimulated with LPS for 2 hours. The higher dose of cisplatin (10 $\mu\text{g/ml}$) even had a stronger effect on the concentrations of bioactive $\text{TNF-}\alpha$, which were reduced to about 7.5% of the control values in this experiment (Figure 10). The effects of the higher dose of cisplatin on the release of IL-6 into the supernatant was less pronounced (36% of the control values).

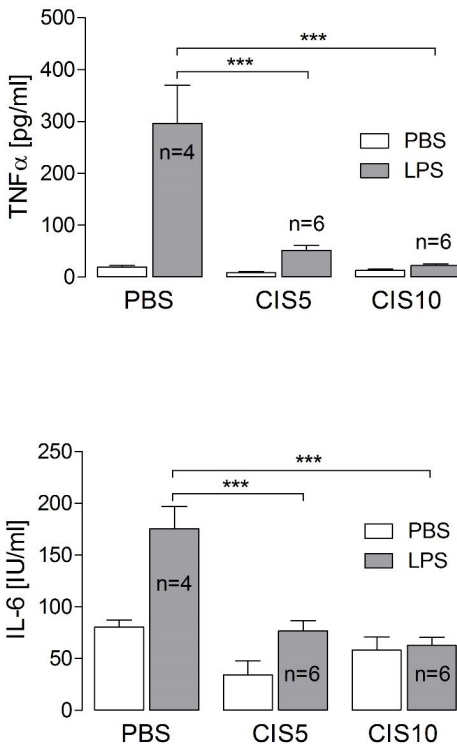


Figure 10:
Concentrations of $\text{TNF-}\alpha$ and IL-6 in supernatants of LPS-stimulated rat DRG primary cultures are reduced in presence of cisplatin

After 24 h of cultivation in presence of PBS (control), 5 or 10 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin, DRG primary cultures were incubated for 120 min with fresh medium containing PBS or LPS (10 $\mu\text{g/ml}$). Columns represent means with SEM. At both tested doses, cisplatin caused a significant reduction of $\text{TNF-}\alpha$ and IL-6 in the supernatants of DRG primary cultures [***: significant difference *versus* control; $p < 0.001$].

We further tested the effects on the LPS-induced expression of TNF- α and IL-6 in DRG cells cultured with or without presence of 5 or 10 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin. As shown in Figure 11, LPS-induced expression of both cytokines was markedly depressed in cells of cisplatin treated DRG primary cultures. These results corresponded to the strong reduction of the numbers of macrophages and satellite glial cells in DRG primary cultures treated with cisplatin (Figures 8 and 9B).

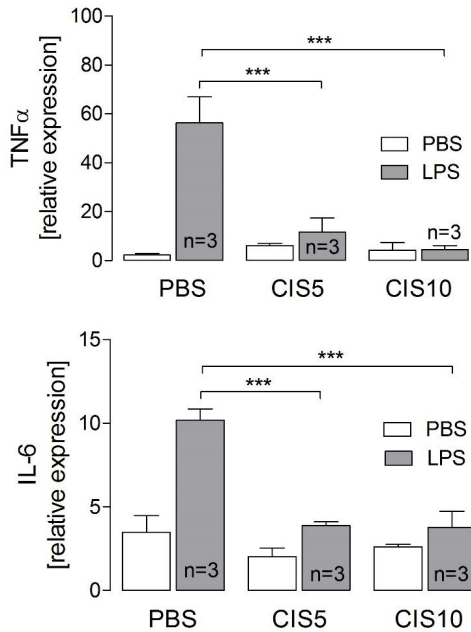


Figure 11: Enhanced expression of TNF- α and IL-6 in cells from rat DRG primary cultures in response to short-term stimulation with LPS is blunted by cisplatin

After 24 h of cultivation on poly-L-lysine coated glass coverslips in presence of PBS, 5 or 10 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin, DRG primary cultures were incubated for 120 min with fresh medium containing PBS (control) or LPS (10 $\mu\text{g/ml}$). Thereafter, the medium was removed, the cells were lysed, and RT-PCR was performed. Each column represents the mean of three independent experiments, in which expression of TNF- α and IL-6 was determined in duplicates. LPS caused an increase of cytokine-expression in the cells of DRG primary cultures, which was strongly depressed in presence of cisplatin in the culture medium [***: significant difference *versus* control; $p < 0.001$].

In addition to the viability test shown in Figure 9A, we performed another series of experiments, in which we tested the effects of cultivation in medium containing 5 or 10 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin in comparison to medium without cisplatin on stimulus-induced Ca^{2+} -signals in neurons from DRG. Histamine, menthol, capsaicin and high concentrations of KCl were used as chemical stimuli for the activation of neurons. The percentages of DRG neurons responding to the respective stimuli were similar irrespective of the presence of cisplatin in the culture medium (Figure 12).

We further evaluated the strength of the measured changes of $[\text{Ca}^{2+}]_i$, i.e. the magnitude of the stimulus-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ peaks (see Figure 1). For histamine and menthol, there was a tendency for higher $[\text{Ca}^{2+}]_i$ peaks after cultivation in presence of the higher dose of cisplatin, however, without statistical significance. Neurons cultured in medium with 10 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin showed a significantly higher Ca^{2+} -response to a high potassium concentration when compared to controls ($p = 0.0174$).

In a final experiment we tested whether the LPS-induced enhanced responses to capsaicin or rapid warming was influenced by cisplatin. We evaluated the strength of stimulus-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signals in DRG neurons, which were cultured for 18-24 h in medium containing 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS and 5 or 10 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin (Figure 13).

As shown in Figure 13 the LPS-induced enhanced responses to capsaicin and warming were just partly antagonized by the presence of cisplatin in the culture medium. The enhanced responsiveness of neurons to stimulation with the TRPV1 agonist capsaicin was still observed but no longer significant (see: Figure 2). On the other hand, the LPS-induced responses to warming were significantly elevated, when cells were cultured in presence of LPS and 10 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin. Measurements of $\text{TNF-}\alpha$ in the supernatants showed, that the presence of cisplatin reduced, but did not abolish the concentration of this cytokine in the supernatant, meaning that an inflammatory component was still present and possibly influencing the neuronal responses to nociceptive stimuli.

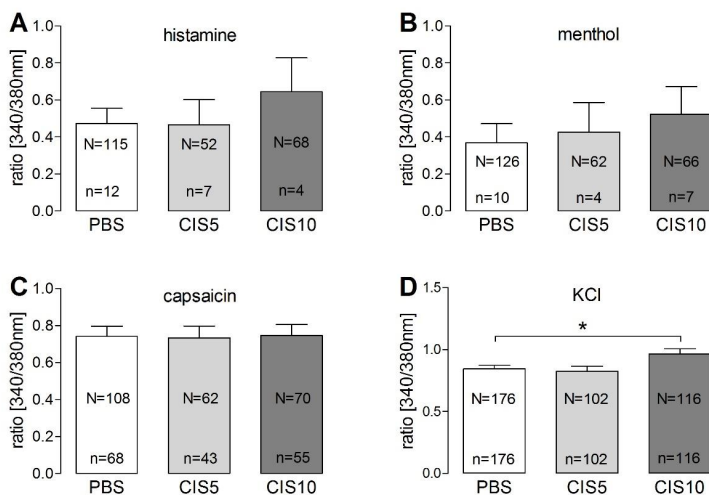


Figure 12: The strength of stimulus-induced Ca^{2+} -signals is not impaired by cisplatin in neurons from DRG primary cultures

After 24 h of cultivation in presence of PBS (control), 5 or 10 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin, DRG primary cultures were employed for Ca^{2+} -imaging experiments. Δratio [340/380 nm] fluorescence values served as measure of intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Columns represent means \pm SEM of those cells, in which a given stimulus (histamine, menthol, capsaicin or KCl) induced an increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in neurons of DRG primary cultures. In neurons cultured in medium containing 10 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin, the strength of the KCl-induced Ca^{2+} -signals was significantly higher compared to controls [N = numbers of tested neurons ; n = numbers of neurons responding to a given stimulus ; *: $p < 0.05$].

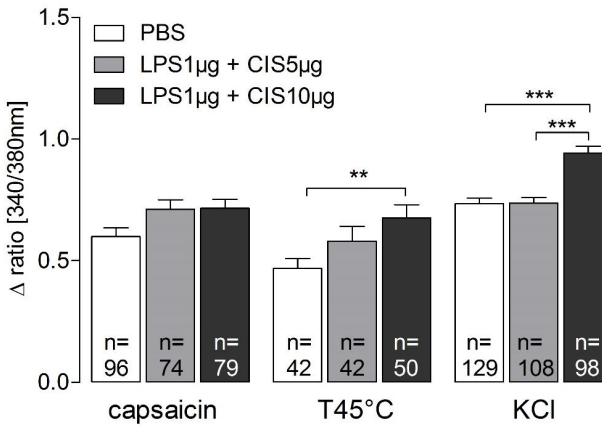


Figure 13: The strength of capsaicin- and warming-induced Ca^{2+} -signals in neurons from DRG primary cultures in presence of LPS and cisplatin

After 24 h of cultivation in presence of PBS (control), or LPS plus cisplatin, DRG primary cultures were employed for Ca^{2+} -imaging experiments. $\Delta\text{ratio [340/380 nm]}$ fluorescence values served as measure of intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Columns represent means \pm SEM of those cells, in which a given stimulus (capsaicin, rapid warming or KCl) induced an increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in neurons of DRG primary cultures. In neurons cultured in medium containing $1\mu\text{g/ml}$ LPS, the strength of the capsaicin-induced Ca^{2+} -signals was significantly higher compared to controls [N = numbers of tested neurons ; n = numbers of neurons responding to a given stimulus ; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$].

DISCUSSION

Primary cultures from dorsal root ganglia can be used for experimental investigation of sensory neurons with electrophysiological or Ca^{2+} -imaging methods, due to the fact, that they maintain their properties to respond to chemical or thermal stimuli (Malin et al. 2007; Passmore 2005). In our experiments we found that almost 75% of all investigated neurons, predominantly smaller neurons with a diameter not larger than 30 μm , responded to the TRPV1 agonist capsaicin with a pronounced increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ indicative of their function as nociceptors (Caterina et al. 2000; Lu et al. 2006; Frias & Merighi 2012). Similar (78% and 73%; Sculptoreanu et al. 2010; Passmore 2005), or lower (64% and 55%; Gold et al. 1996; Lu et al. 2006) percentages of capsaicin-responsive cultured rat DRG neurons were reported by other authors. All neurons, which responded with Ca^{2+} -signals to rapid warming, were also activated by capsaicin (Figure 1). This observation corresponded to data from an electrophysiological study (Kirschstein et al. 1997) and from a Ca^{2+} -imaging study (Savidge et al. 2001). In these studies, DRG neurons, which responded to heat with inward currents or Ca^{2+} -signals, showed similar responses to capsaicin. In our DRG primary cultures we further identified a population of 10% menthol-responsive neurons (Figure 1B), i.e. putative cold-sensors (Braun et al. 1980; Schäfer et al. 1986; Reid et al. 2002). This percentage of menthol-activated neurons corresponds exactly with that noted in other studies (Okazawa et al. 2000; Okazawa et al. 2002).

Just 4% of cultured DRG neurons, putative nociceptors as well as cold-sensors, responded to PGE_2 with an increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Figure 1C). PGE_2 is a molecule, which is produced in increased amounts under conditions of inflammation, via the inducible forms of cyclooxygenases and PGE-synthases, namely COX-2 and mPGES-1. An increased production of PGE_2 under inflammatory conditions is likely and PGE_2 is discussed as a mediator that contributes to the manifestation of neuropathic pain (Ma et al. 2012). Although the number of neurons directly responding to PGE_2 with Ca^{2+} -signals remained small, even under inflammatory culture conditions, it is possible that PGE_2 modulates the responses to other stimuli (Simm et al. 2016). In this context it has to be considered that DRG not only consist of neurons, but also of non-neuronal cells such as satellite glial cells (Hanani 2005) and a moderate number of ED1-positive cells of the macrophage-

monocyte lineage (Li et al. 2004), which were categorized as macrophages (Hu & McLachlan 2003; Dubovy et al. 2007). Both of these cell types can be readily activated upon inflammatory stimulation in *in vivo* or *ex vivo* conditions (Li et al. 2004; Blum et al. 2014; Blum et al. 2017; Mitterreiter et al. 2017). Inflammatory activation of DRG also affects the properties of neurons, as indicated by the enhanced responsiveness of putative nociceptive neurons to capsaicin (Figure 2). There is evidence that pro-inflammatory cytokines, namely TNF- α and IL-6, are involved in such effects (Hensellek et al. 2007; Andratsch et al 2009; Fang et al. 2015). To define the specific contribution of TNF- α and IL-6 in the inflammatory enhancement of nociceptive signals, was not the primary aim of this study. We were rather interested in the general contribution of glial elements to the manifestation of neuropathic pain in the experimental model of DRG primary cultures. One central aim of our study was thus to characterize some of the cellular responses with inflammatory stimulation, and the contributions of the cellular phenotypes of DRG primary cultures to the production of inflammatory mediators.

For the first time, we therefore tested the effects of inflammatory stimulation, with LPS, on the expression, release and activation of several markers of inflammation in DRG primary cultures. Upon stimulation with LPS, a pronounced release of bioactive TNF- α and IL-6 into the supernatants of DRG primary cultures was measured. In line with *in vivo* experiments (Li et al. 2004), we could ascribe a portion of the production of TNF- α to LPS-stimulated ED1-positive macrophages. Although TNF- α immunoreactivity was rather weak in satellite glial cell, their contribution to an LPS-induced formation of pro-inflammatory cytokines cannot be ruled out. In addition, we observed a strong activation of the inflammatory transcription factor NF-IL6 in macrophages and to a smaller degree, also in neurons of DRG primary cultures. In neurons, we also observed a nuclear translocation of a second inflammatory transcription factor, i.e. STAT3. This IL-6-activated transcription factor has been suggested to contribute to nociceptor sensitization via upregulation of TRPV1 (Fang et al. 2015). STAT3 has further been shown to contribute to the formation of PGE₂ via induction of COX-2 (Rummel et al. 2006). This means that satellite glial cells and macrophages, which are activated by PAMPs or DAMPs due to infection or injury, can affect neurons via the release of inflammatory mediators and thereby initiate neuronal changes, that may contribute to the manifestation of hyperalgesia and neuropathic pain (Ohara et al. 2009; Blum et al. 2017). Using primary cultures of DRG, it will be possible to investigate and characterize such neuronal changes

evoked by the interplay between the distinctive cell types, present in these cultures, under inflammatory conditions.

Evidence for a critical role of glial cells as producers of inflammatory mediators was further supported by the experiments, in which DRG primary cultures were exposed to cisplatin. Cisplatin is one of the most effective chemotherapeutic agents used for treating cancer. Neurotoxicity and peripheral neuropathies are common side effects of this drug (Gregg et al. 1992; Podratz et al. 2011). The aim of our experiments was to target the glial elements of DRG primary cultures without damaging or even killing the neurons. Therefore, we used doses of cisplatin, which have been shown by others to not affect the survival of neurons derived from DRG (Jiang et al. 2008). In line with this study the chosen doses of cisplatin did not reduce the survival rates of DRG neurons in our experiments (Figure 9A). Also the magnitude of Ca^{2+} -signals in response to various stimuli was not impaired in DRG neurons by the presence of cisplatin in the culture medium (Figure 9). The strength of neuronal Ca^{2+} -signals induced by histamine or menthol even tended to be higher, when the higher dose of 10 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin was added to the medium. The KCl-induced Ca^{2+} -signals were significantly higher under these conditions. As a possible explanation for this observation, we assume that the pronounced inhibition of cisplatin on the growth of satellite glial cells may have allowed better access of the stimulating substances to the neuronal surface. Reduction of the growth of satellite glial cells, by cisplatin or drugs with similar properties, without impairment of characteristic neuronal responses might therefore serve as a tool to prolong the time intervals, in which neurons from rat DRG can be investigated experimentally. Our main interest in this context related to the cellular sources of cytokines and other putative mediators of inflammation, which are generated within DRG *in vivo* or by DRG primary cultures *in vitro*. Taking $\text{TNF-}\alpha$ and IL-6 as representative examples, we showed on the mRNA and protein level that ED1-positive macrophages, but possibly also satellite glial cells, substantially contribute to the LPS-induced formation of these cytokines by DRG primary cultures (Figures 3 and 4). Treatment with cisplatin, on the other hand, dramatically reduced the number of macrophages (and satellite glial cells) and thereby the LPS-induced expression and release of $\text{TNF-}\alpha$ and IL-6 into the supernatants of our cultures (Figures 10 and 11). $\text{TNF-}\alpha$ and IL-6, which are released by glial elements within the sensory ganglia during inflammation or injury, could readily affect neurons resulting in pathologic changes contributing to exaggerated or chronic pain (Hensellek et al. 2007;

Milligan & Watkins 2009; Ohara et al. 2009; Fang et al. 2015; Krukowski et al. 2016). Evidence for such an effect of cytokines is also provided by the data shown in Figure 2, i.e. enhanced capsaicin-induced Ca^{2+} -signals in neurons cultured under inflammatory conditions. In a final experiment we therefore tried to reduce or abolish the effect of LPS on the strength of Ca^{2+} -signals to putative nociceptive stimuli, by adding cisplatin to the culture medium (Figure 13). This strategy was somewhat successful, since the LPS-mediated increase of capsaicin-evoked Ca^{2+} -signals was no longer significantly different to controls. On the other hand, heating-induced signals remained stronger in neurons from DRG cultures in presence of cisplatin and LPS. Measurements of $\text{TNF-}\alpha$ in the supernatants showed that LPS-induced concentrations of $\text{TNF-}\alpha$ (and possibly also of other mediators of inflammation) could be attenuated but not blunted by adding cisplatin to the medium. Collectively our data still clearly favors a significant contribution of DRG macrophages and satellite glial cells in mediating DRG inflammation under conditions of systemic inflammation.

The experimental *in vitro* model of DRG primary cultures, which include all cellular elements of sensory ganglia *in vivo*, except endothelial cells, offers the opportunity to test numerous immunomodulatory or neuromodulatory substances with proposed pro- or anti-inflammatory properties, including neuropeptides, cytokines, adipokines, prostaglandins and others. The experimental read-outs, which were used in our study, could thus be applied to characterize the possible effects of these substances on the cellular elements of DRG.

REFERENCES

- Andratsch M, Mair N, Constantin CE, Scherbakov N, Benetti C, Quarta S, Vogel C, Sailer CA, Üceyler N, Brockhaus J, Martini R, Sommer C, Zeilhofer HU, Müller W, Kuner R, Davis JB, Rose-John S, Kress M (2009) A key role for gp130 expressed on peripheral sensory nerves in pathologic pain. *J Neurosci* 29: 13473-13483.
- Araldi D, Ferrari LF, Lotufo CM, Vieira AS, Athié MCP, Figueiredo JG, Duarte DB, Tambeli CH, Ferreira SH, Parada CA (2013) Peripheral inflammatory hyperalgesia depends on the COX increase in the dorsal root ganglion. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 3603-3608.
- Bautista DM, Siemens J, Glasezer JM, Tsurunda PR, Basbaum AI, Stucky CL, Jordt SE, Julius D (2007) The menthol receptor TRPM8 is the principle detector of environmental cold. *Nature* 448: 204-208.
- Blum E, Procacci P, Conte V, Hanani M, (2014) Systemic inflammation alters satellite glial cell function and structure. A possible contribution to pain. *Neuroscience* 274: 209-217.
- Blum E, Procacci P, Conte V, Sartori P, Hanani M (2017) Long term effects of lipopolysaccharide on satellite glial cells in mouse dorsal root ganglia. *Exp Cell Res* 350: 236-241.
- Braun HA, Bade H, Hensel H (1980) Static and dynamic discharge patterns of bursting cold fibers related to hypothetical receptor mechanisms. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 386: 1-9.
- Cairns BE, Arendt-Nielsen L, Sacerdote P (2015) Perspectives in pain research 2014: neuroinflammation and glial cell activation: the cause of transition from acute to chronic pain? *Scand J of Pain* 6: 3-6.
- Caterina MJ, Julius D (2001) The vanilloid receptor: A molecular gateway to the pain pathway. *Ann Rev Neurosci* 24: 487-517.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeit KR, Koltzenburg M, Basbaum AJ, Julius D (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288: 306-313.
- Damm J, Roth J, Gerstberger R, Rummel C (2017) The use of siRNA as a pharmacological tool to assess a role for the transcription factor NF-IL-6 in the brain under *in vitro* and *in vivo* conditions during LPS-induced inflammatory stimulation. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 28: 563-571.
- Dubovy P, Tuckova L, Jancalek R, Svizenska I, Klusakova I (2007) Increased invasion of ED-1 positive macrophages in both ipsi- and contralateral dorsal root ganglia following unilateral nerve injuries. *Neurosci Lett* 427: 88-93.
- Fang D, Kong LY, Cai J, Li S, Liu XD, Han JS, Xing GG (2015) Interleukin-6-mediated functional upregulation of TRPV1 receptors in dorsal root ganglion neurons through the activation of JAK/PI3K signaling pathway: roles in the development of bone cancer pain in a rat model. *Pain* 156: 1124-1144.
- Frias B, Merighi A (2016) Capsaicin, nociception and pain. *Molecules* 21: 797.

- Fuchs F, Damm J, Gerstberger R, Roth J, Rummel C (2013) Activation of the inflammatory transcription factor nuclear factor interleukin-6 during inflammatory and psychological stress. *J Neuroinflamm* 10: 140.
- Gadani SP, Walsh JT, Lukens JR, Kipnis J (2015) Dealing with danger in the CNS: the responses of the immune system to injury. *Neuron* 87: 47-62.
- Gold MS, Dastmalchi S, Levine JD (1996) Co-expression of nociceptor properties in dorsal root ganglion neurons from the adult rat in vitro. *Neuroscience* 71: 265-275.
- Gregg RW, Molepo JM, Monpetit VJA, Mikael NZ, Redmond D, Gadia M, Steward DJ (1992) Cisplatin neurotoxicity: the relationship between dosage, time, and platinum concentration in neurologic tissues, and morphologic evidence of toxicity. *Journal of Clin Oncol* 10: 795-803.
- Hanani M (2005) Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res Rev* 48: 457-476.
- Harden LM, Rummel C, Laburn HP, Damm J, Wiegand F, Poole S, Gerstberger R, Roth J (2014) Critical role for peripherally-derived interleukin-10 in mediating the thermoregulatory manifestations of fever and hypothermia in severe forms of lipopolysaccharide-induced inflammation. *Pflugers Arch – Eur J Physiol* 466: 1451-1466.
- Hensellek S, Brell P, Schaible HG, Bräuer R, Segond von Banchet G (2007) The cytokine TNF α increases the proportion of DRG neurones expressing the TRPV1 receptor and ERK activation. *Mol Cell Neurosci* 36: 381-391.
- Hu P, McLachlan EM (2003) Distinct functional types of macrophage in dorsal root ganglia and spinal nerves proximal to sciatic and spinal nerve transections in the rat. *Exp Neurol* 184: 590-605.
- Hutchinson MR, Buijs M, Tuke J, Kwok YH, Gentgal MI, Williams D, Rolan P (2013) Low-dose endotoxin potentiates capsaicin-induced pain in man: Evidence for a pain neuroimmune connection. *Brain Behav Immun* 30: 3-11.
- Jiang Y, Guo C, Vasko MR, Kelley MR (2008). Implications of apurinic / apyrimidinic endonuclease in reactive oxygen signalling response after cisplatin treatment of dorsal root ganglion neurons. *Cancer Res* 68: 6425-6434.
- Kielian T (2006) Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *J Neurosci Res* 83: 711-730.
- Kirschstein T, Büsselberg D, Treede RD (1997) Coexpression of heat-evoked and capsaicin-evoked inward currents in acutely dissociated rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 231: 33-36.
- Krukowski K, Eijkelkamp N, Laumet G, Hack CE, Li Y, Dougherty PM, Heijnen CJ, Kavelaars A (2016) CD8⁺ T cells and endogenous IL-10 are required for resolution of chemotherapy-induced neuropathic pain. *J Neurosci* 36: 11074-11083.
- Li Y, Ji A, Weihe E, Schäfer MKH (2004) Cell-specific expression and lipopolysaccharide-induced regulation of tumor necrosis factor α (TNF α) and TNF receptors in rat dorsal root ganglion. *J Neurosci* 24: 9623-9631.

- Linte RM, Ciobanu C, Reid G, Babes A (2007) Desensitization of cold- and menthol-sensitive rat dorsal root ganglion neurons by inflammatory mediators. *Exp Brain Res* 178: 89-98.
- Lu SG, Zhang X, Gold MS (2006) Intracellular calcium regulation among subpopulations of rat dorsal root ganglion neurons. *J Physiol* 577.1: 169-190.
- Ma W, St-Jaques B, Duarte PC (2012) Targeting pain mediators induced by injured nerve-derived COX2 and PGE2 to treat neuropathic pain. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 16: 6.
- Malin SA, Davis BM, Molliver DC (2007) Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nature Protocols* 2: 152-160.
- Milligan ED, Watkins LR (2009) Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nature Rev Neurosci* 10: 23-36.
- Mitterreiter JG, Ouwendijk WJD, van Velzen M, van Nierop GP, Osterhaus ADME, Verjans GMGM (2017) Satellite glial cells in human trigeminal ganglia have a broad expression of functional Toll-like receptors. *Eur J Immunol* 47: 1181-1187.
- Ohara PT, Vit J-P, Bhargava A, Romero M, Sundberg C, Charles AC, Jasmin L (2009) Gliopathic pain: when satellite glial cells go bad. *Neuroscientist* 15: 450-463.
- Okazawa M, Takao K, Hori A, Shiraki T, Matsumura K, Kobayashi S (2002) Ionic basis of cold receptors acting as thermostats. *J Neurosci* 22: 3994-4001.
- Okazawa M, Terauchi T, Shiraki T, Matsumura K, Kobayashi S (2000) *l*-Menthol-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase and impulses in cultured sensory neurons. Neuroreport 11: 2151-2155.
- Ott D, Murgott J, Rafalzki S, Wuchert F, Schmalenbeck B, Roth J, Gerstberger R (2010) Neurons and glial cells of the rat *organum vasculosum laminae terminalis* directly respond to lipopolysaccharide and pyrogenic cytokines. *Brain Res* 1363: 93-106.
- Ott D, Simm B, Pollatzek E, Murgott J, Gerstberger R, Rummel C, Roth J (2015) Prostaglandin D2 modulates calcium signals induced by prostaglandin E2 in neurons of rat dorsal root ganglia. *Neurosci Lett* 597: 159-163.
- Passmore GM (2005) Dorsal root ganglion neurones in culture: A model system for identifying novel analgesic targets. *J Pharmacol Toxicol Meth* 51: 201-208.
- Peier AM, Moorich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A (2002) A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108: 705-715.
- Podratz JWL, Knight AM, Ta LE, Staff NP, Gass JM, Genelin K, Schlattau A, Lathroum L, Windebank AJ (2011) Cisplatin-induced mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. *Neurobiol Dis* 41: 661-668.
- Reid G, Babes A, Pluteanu F (2002) A cold- and menthol-activated current in rat dorsal root ganglion neurones: properties and role in cold transduction. *J Physiol* 545.2: 595-614.
- Roth J, Blatteis CM (2014) Mechanisms of fever production and lysis: Lessons from experimental LPS fever. *Compr Physiol* 4: 1563-1604.

- Rummel C (2016) Inflammatory transcription factors as activation markers and functional readouts in immune-to-brain communication. *Brain Behav Immun* 54: 1-14.
- Rummel C, Sachot C, Poole S, Luheshi GN (2006) Circulating interleukin-6 induces fever through a STAT3-linked activation of COX-2 in the brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R1316-R1326.
- Russel FA, Fernandes ES, Courade J-P, Keeble JE, Brain SD (2009) Tumour necrosis factor alpha mediates transient receptor potential vanilloid 1-dependent bilateral thermal hyperalgesia with distinct peripheral roles of interleukin-1beta, protein kinase C and cyclooxygenase-2 signalling. *Pain* 142: 264-274.
- Savidge JR, Ranasinghe SP, H.P. Rang HP (2001) Comparison of intracellular calcium signals evoked by heat and capsaicin in cultured rat dorsal root ganglion neurons and in a cell line expressing the rat vanilloid receptor VR1. *Neuroscience* 102: 177-184.
- Schäfer K, Braun HA, Isenberg C (1986) Effect of menthol on cold receptor activity. Analysis of receptor processes. *J Gen Physiol* 88: 757-76.
- Schweighöfer H, Rummel C, Roth J, Rosengarten B (2016) Modulatory effects of vagal stimulation on neurophysiological parameters and the cellular immune response in the rat brain during systemic inflammation. *Int Care Med Exp* 4: 19.
- Sculptoreanu A, Kullmann FA, Artim DE, Bazley FA, Schopfer F, Woodcock S, Freeman BA, de Groat WC (2010) Nitro-oleic acid inhibits firing and activates TRPV1- and TRPA1-mediated inward currents in dorsal root ganglion neurons from adult male rats. *J Pharmacol Exp Therap* 333: 883-895.
- Simm B, Ott D, Pollatzek E, Murgott J, Gerstberger R, Roth J (2016) Effects of prostaglandin E₂ on cells cultured from the rat *organum vasculosum laminae terminalis* and median preoptic nucleus. *Neuroscience* 313: 23-35.
- Soares DM, Ott D, Melo MC, Souza GE, Roth J (2013) Chemokine ligand (CCCL-3) promotes an integrated febrile response when injected within preoptic area (POA) of rats and induces calcium signaling in cells of POA microcultures but not TNF- α or IL-6 synthesis. *Brain Behav Immun* 34: 120-129.
- Soares DM, Santos DR, Rummel C, Ott D, Melo MCC, Roth J, Calixto JB, G.E.P. Souza GEP (2017) The relevance of kalikrein-kinin system via activation of B₂ receptor in LPS-induced fever in rat. *Neuropharmacology* 126: 84-96.
- Tan C-H, McNaughton PA (2016) The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth, *Nature* 536: 460-463.
- Walker AK, Kavelaars A, Heijnen CJ, Dantzer R (2013) Neuroinflammation and comorbidity of pain and depression. *Pharmacol Rev* 66: 80-101.
- Watkins LR, Maier SF, Goehler LE (1995) Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain* 63: 289-302.
- Wuchert F, Ott D, Murgott J, Rafalzik S, Hitzel N, Roth J, Gerstberger R (2008) Rat area postrema microglial cells act as sensors for the Toll-like receptor-4 agonist lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol* 204: 66-74.

**2nd Publication: Effects of thermal stimulation on neurons
and astrocytes cultured from the rat median preoptic nucleus**

Veröffentlicht in: NeuroReport, 2018; 29: 1469-1472

**Effects of thermal stimulation on neurons and astrocytes cultured from
the rat median preoptic nucleus**

Stephan Leisengang, Daniela Ott, Rüdiger Gerstberger, Christoph Rummel and

Joachim Roth

Institute for Veterinary-Physiology and -Biochemistry, Justus-Liebig-University of
Giessen, Frankfurter Strasse 100, D-35392 Giessen, Germany

Corresponding author:

Dr. Joachim Roth

Institute for Veterinary-Physiology and -Biochemistry, Justus-Liebig-University of
Giessen

Frankfurter Strasse 100, D-35392 Giessen, Germany

Phone: +49-641 - 99 - 38850

Fax: +49-641 - 99 - 38159

E-mail: Joachim.Roth@vetmed.uni-giessen.de

ABSTRACT

Warming or cooling of the median preoptic nucleus (MnPO) *in vivo* evokes appropriate thermoregulatory responses. In the present study, we aimed to investigate whether single neurons (and astrocytes) of primary rat MnPO cell cultures maintain properties, which are consistent with their putative role within the central thermoregulatory structures. Using the fura-2 ratio imaging technique, we therefore measured changes of intracellular Ca^{2+} concentrations ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in neurons of rat MnPO primary cultures stimulated by rapid cooling from 37 °C to 25 °C, or warming from 37 °C to 45 °C, or glutamate, the transmitter which transfers thermal information to MnPO neurons. In a first experiment, we tested the responses to external cooling in a group of 212 neurons. 165 of these neurons were responsive to stimulation with glutamate; just 4 of them responded to the cold-stimulus with an increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$; and only one of these neurons was responsive to stimulation with menthol. In a second experiment, 24 out of 327 neurons and 23 out of 241 astrocytes responded to external warming with quick and pronounced Ca^{2+} signals. Another 33 neurons (10%) showed a moderate and slowly developing increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during the warming, which reflected the temperature changes in the chamber. These data correspond to properties of MnPO neurons upon thermal stimulation obtained by other experimental approaches. Primary cultures derived from the rat MnPO can thus be used to investigate neuronal thermosensitive properties and their possible modulation by other stimuli.

Key words: median preoptic nucleus; glutamate; thermal stimulation; calcium imaging

INTRODUCTION

Cooling or warming of the preoptic / anterior hypothalamic area (POAH) *in vivo* evokes appropriate cold or heat defense responses [1, for review]. Brain slice preparations [2], acutely dissociated neurons [3] or primary cultures derived from the POAH [4] primarily of rodent brains were used to investigate neuronal responses to warming or cooling by means of electrophysiology (i.e. extracellular recording of action potentials) or intracellular calcium imaging [1-4]. The discovery of thermally activated ion channels from the transient receptor potential (TRP) channel family provided novel insight into mechanisms mediating detection of cold or warm temperatures by somatosensory or hypothalamic neurons [4-6]. In preparations of the murine POAH the TRPM2 channel was recently detected in a subpopulation of neurons and introduced as the putative central warm sensor able to detect increased brain temperatures and prevent overheating [1, 4].

Within the POAH, the median preoptic nucleus (MnPO) attracted specific attention with special regard to thermoregulation and other vital homeostatic functions [7, 8]. Neurons within the MnPO represent a crucial component of the central thermoregulatory structures. They receive information from peripheral thermosensory pathways, *via* afferent glutamatergic projections from the lateral parabrachial nucleus in the brainstem [9]. In spite of the critical importance of the MnPO as the, perhaps, most important central thermoregulatory structure, primary cultures of the MnPO have not yet been used to investigate cellular responses to warming or cooling. We recently established and used a primary culture of rat MnPO and observed responses to stimulation with the transmitter glutamate and the neuromodulator prostaglandin E₂ (PGE₂), which are compatible with the proposed role of this small brain site in thermoregulation and the manifestation of fever [10, 11]. We therefore hypothesized that postulated intrinsic thermoresponsive properties of neurons within the MnPO are manifest and can be detected at the level of primary cultures.

The outcome of the experiments reported here can be summarized as follows. We identified single neurons responding to cooling and a population of neurons responding to warming at the level of MnPO primary cultures. Surprisingly we also identified a population of warm-responsive astrocytes, which may represent another target for thermoregulatory relevant stimuli [12].

MATERIALS AND METHODS

Animals

Wistar rat pups of both sexes obtained from an in-house breeding colony were used for all experiments. The mean litter size was 12 pups per mother animal. Parent animals originated from Charles River WIGA (Sulzfeld, Germany). Animal care, breeding and experimental procedures were performed according to the guidelines approved by the Hessian Ethical Committee (approval numbers GI 580_M). The pups were reared by their mothers in large M4-size cages. Room temperature was set to 24 ± 1 °C and relative humidity at 50%, and artificial lights were on from 7:00 AM to 7:00 PM.

Isolation and cultivation of MnPO primary cell cultures

The primary culture of the rat MnPO was established from topographically excised brain tissue of 4–6 days old Wistar rat pups, which were in a fed stage. Self-sustained circadian rhythms are observed in rat pups at the age of 1–2 weeks [13]. Therefore, we don't consider the circadian rhythm as a major issue in our experiments. Five animals per preparation were quickly decapitated with sharp scissors and the heads were immersed in cold 70% ethanol. Each brain was immediately removed from the skull under aseptic conditions, fixed onto a Teflon®-block with Histoacryl® tissue glue (Braun AG, Melsungen, Germany), and rapidly transferred to a chamber containing ice-cold oxygenated Gey's Balanced Salt Solution (GBSS) with 0,5% D-glucose (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany). The chamber was fixed to a vibratome (752 M Vibroslice; WPI, Berlin, Germany) and serial coronal brain slices (400 µm) were cut at the level of the anterior hypothalamus. Using the anterior commissure and optic chiasm as main neuroanatomical landmarks, the section containing the MnPO was selected. The MnPO region was dissected under stereomicroscopic control (SMZ-U; Nikon, Düsseldorf, Germany) from the surrounding anterior third ventricular region using fine eye scissors. After enzymatic digestion and trituration of tissue, the MnPO-derived single cell suspension was plated on poly-L-lysine coated coverslips (CELL-VU Grid DRM800; Millenium Science, New York, NY USA), which formed the bottom of a flexiPerm micro chamber (Greiner-Bio, Frickenhausen, Germany). Further details on the procedures and cultivation conditions have been published elsewhere [11, 12].

Measurement of intracellular calcium in single fura-2-loaded MnPO cells

After 4-5 days of cultivation in Neurobasal A medium (Invitrogen, San Diego, CA, USA) [11] the MnPO cells were loaded with 2 μ M fura-2-AM (Life Technologies, Darmstadt, Germany) in complete medium for 45 min in a humidified atmosphere of 5% CO₂ / 95% air at 37 °C. For intracellular Ca²⁺-measurements, glass coverslips were placed under an inverted microscope (IMT-2; Olympus, Hamburg, Germany) in a specially constructed Teflon® culture chamber and superfused with Ca²⁺-imaging buffer consisting of 5mM HEPES, 130mM NaCl, 5mM KCl, 1.0mM MgCl₂, 1.25mM CaCl₂ and 10mM D-glucose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), pH 7.4 with a flow rate of 2 ml per minute. Fluorescence measurements were performed using a filterwheel-based excitation system and analyzed with MetaFluor 7.7.8.0 software (Visitron GmbH, Puchheim, Germany). After defining regions of interest for single cells, the time course of emitted fluorescence (>515 nm) after alternating excitations at 340 and 380 nm, respectively, was recorded [11]. The 340 / 380 ratios proportional to [Ca²⁺]_i were computed and analyzed. Measurements of [Ca²⁺]_i were performed at an initial chamber temperature of 37 °C, which could rapidly be cooled down to 25 °C or warmed up to 45 °C. Glutamate (10 μ M) or menthol (100 μ M, both from Sigma Aldrich) was applied to the recording chamber *via* superfusion for three minutes. At the end of the experiments, cells were exposed to Ca²⁺-imaging buffer consisting of 1.5mM HEPES, 43mM NaCl, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 1.0mM CaCl₂ and 10mM D-glucose (Sigma Aldrich Chemie GmbH). The treatment with the high K⁺-concentration and the resulting cellular responses served as a vitality test for neurons and to some degree also for astrocytes

Immunocytochemical characterization of MnPO cell cultures

Each single cell analyzed with calcium imaging could subsequently be identified according to its exact positioning on the gridded glass coverslips [11]. Phenotypic identification of MnPO cells was carried out by immunolabeling with antibodies directed against cell-specific marker proteins such as glial fibrillary acidic protein for astrocytes (rabbit anti-GFAP; DAKO, Hamburg, Germany) and microtubule associated protein 2 for neurons (mouse AP-20 anti- MAP2a+b; Sigma Aldrich). Therefore, the cells were fixed with 4% freshly prepared paraformaldehyde in PBS (Sigma Aldrich), pH 7.4, for 15 min at RT and immunolabeled as described elsewhere [11, 12]. Cellular nuclei were

labeled by an incubation with 2-(4-amidinophenyl)-1H-indole-6-carboxyamidine (DAPI; Mobitec, Goettingen, Germany) for 8 minutes. The cells were examined with an epifluorescence microscope (Olympus BX50, Hamburg, Germany) equipped with the appropriate filter systems.

Evaluation

The numbers of cells of a given cellular phenotype under determined experimental conditions were expressed as percentage (%) of all cells of this phenotype investigated. Stimulus-induced, transient increases of $[Ca^{2+}]_i$ were expressed as the difference between resting $[Ca^{2+}]_i$ measured prior to the respective stimulation and the stimulus-induced $[Ca^{2+}]_i$ peak (Δ ratio [340/380 nm]). A difference in Δ ratio [340/380 nm] of more than 0.05 was considered to be a stimulus-induced Ca^{2+} -signal, which can be regarded as a strict exclusion criterion. Especially for cells responding to warmth, we only considered a given cell as warm-responsive, when there was a clear Ca^{2+} -transient (see Figure 2). The Δ ratio values are presented as means \pm standard error of the mean (SEM).

RESULTS

In the first experiment we tested and evaluated the responsiveness of MnPO micro cultures to cooling, menthol, and superfusion with glutamate-containing Ca^{2+} imaging buffer. Quantitative analysis of these experiments revealed that only four out of 212 investigated MnPO neurons responded to cooling with an increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Figure 1B). Just one neuron showed a Ca^{2+} signal in response to menthol. The majority of this population of MnPO neurons, 165 out of 212 (about 75%), were activated by glutamate. An example for a cold and glutamate responsive MnPO-neuron is shown in Figure 1A. Astrocytes responding to cooling or menthol were not detected in this experiment.

In the second experiment we studied the effects of rapid warming from 37-45 °C on MnPO primary cultures. Some 24 out of 327 neurons (7.5%, Figure 2B) and 23 out of 241 astrocytes (9.5%, Figure 2D) responded to the warm stimulus with pronounced Ca^{2+} -transients, as shown in the respective upper traces from Figure 2A and C. Another 33 neurons (10%) and another 107 (44%) astrocytes showed a slowly developing increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during the warming, which reflected the temperature changes in the chamber. An example for this response pattern is shown by the lower trace of an investigated astrocyte in Figure 2C. Again, the majority of all tested neurons with regard to warm-sensitivity responded to glutamate with pronounced Ca^{2+} -transients. Primary cultures of the rat MnPO can thus be used to investigate the effects of thermal stimulation and the possible modulation of the thermally evoked responses by other stimuli.

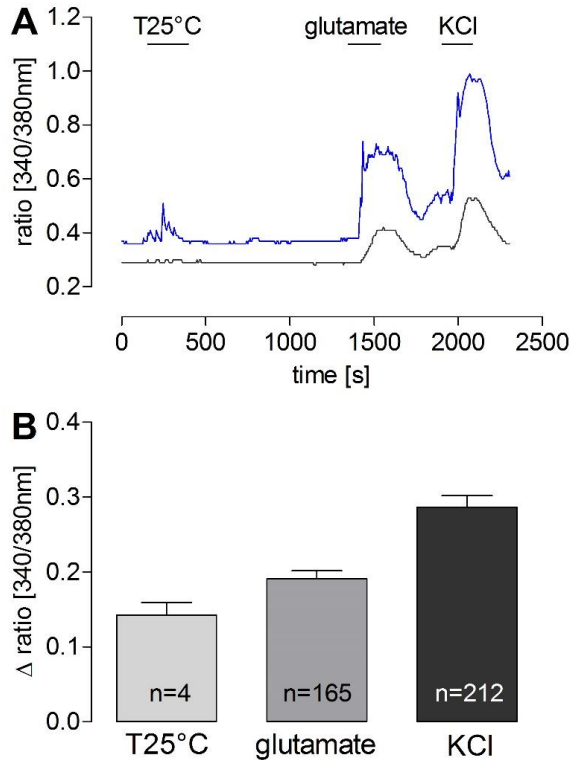


Figure 1: Few neurons from MnPO primary cultures directly respond to cooling with an increase of $[Ca^{2+}]_i$

A: Examples of tracings recorded from two neurons in a primary micro culture derived from the MnPO responding (blue) or not responding (grey) to cold-stimulation. Both neurons responded to superfusion with glutamate or buffer containing a high concentration of KCl (50 mM).

B: Δ ratio [340/380 nm] fluorescence values as measure of $[Ca^{2+}]_i$. Columns represent means \pm SEM of those neurons, which showed cold-, glutamate-, or KCl-induced increase of $[Ca^{2+}]_i$.

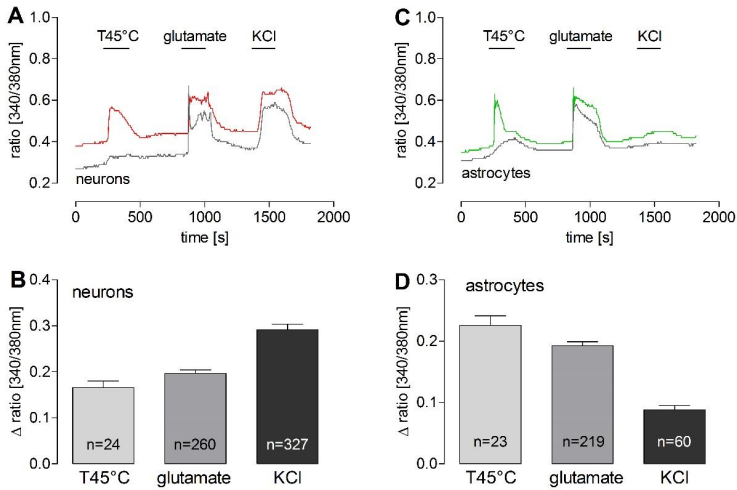


Figure 2: Neurons and astrocytes from MnPO primary cultures directly respond to warming with an increase of $[Ca^{2+}]_i$

A, C: Examples of tracings recorded from two neurons (A) and two astrocytes (C) of a primary micro culture derived from the MnPO responding (red / green) or not responding (grey) to warm stimulation. Both neurons responded to superfusion with glutamate or buffer containing a high concentration of KCl (50 mM), astrocytes responded to glutamate.

B, D: Δ ratio [340/380 nm] fluorescence values as measure of $[Ca^{2+}]_i$. Columns represent means \pm SEM of those neurons (B) or astrocytes (D), which showed warm-, glutamate-, or KCl-induced increase of $[Ca^{2+}]_i$.

DISCUSSION

Neuronal structures within the POAH not only receive sensory input from peripheral thermosensors in the skin [9], this brain site also contains neurons with intrinsic thermosensitive properties [1]. Cold sensitive afferent nerve endings are predominantly located in the skin [14] and the TRP channel TRPM8 plays an important role in the detection of environmental cold [5, 6]. Upon stimulation with cold or menthol, TRPM8 is activated resulting in measurable influx of Ca^{2+} , as determined in cultured neurons of dorsal root ganglia [5, 6, 15, 16]. There is some evidence for the existence of few hypothalamic neurons, which are classified as cold sensors due to an increase of their firing rate during cooling [2, 3]. Acutely dissociated cells of the rat hypothalamus included a small number of neurons, which showed a rise of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ upon cold-stimulation [3]. In our primary culture of the rat MnPO the portion of cold-responsive neurons was even lower (about 2%, Figure 1B) than in the aforementioned studies on brain slices or acutely dissociated neurons. Whether or not these few neurons are equipped with TRPM8 will have to be determined. At least there is some modest evidence for the expression of TRPM8 in the mouse hypothalamus [17].

In line with electrophysiological studies on hypothalamic brain slices [2, 18] and with a recent study employing Ca^{2+} -imaging on cells cultured from the preoptic anterior hypothalamic area [4], we detected a substantial population of neurons, which responded to warming with pronounced Ca^{2+} -transients (7.5%) or with a slow increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during the warming and a slow decrease during resetting of the chamber temperature (10%). According to recently published data, the observed Ca^{2+} -fluxes are mediated by the ion channel TRPM2 [4]. We could demonstrate that these warm-responsive Ca^{2+} -signals are functionally present within a small and defined sub-structure of the POAH, i.e. the MnPO. This structure is critical for the central control of body temperature [7, 8]. Having established the primary culture of the MnPO and the possibility to identify putative warm-sensitive neurons in this culture, we will be able to determine effects of substances with putative pyrogenic and anti-pyretic properties [10] on these neurons. This approach may be used to study substances and mechanisms that modulate or even suppress fever under *in vivo* conditions.

Another final result of our study was rather surprising. In addition to neurons, we identified a population of astrocytes (about 10%), which responded to warming with pronounced Ca^{2+} -transients. There are two possible explanations for this result. First, neurons activated by rapid warming might have released excitatory transmitters like glutamate, which in turn could have activated astrocytes in close proximity *via* specific glutamate receptors. This explanation is supported by our observation that warm-responsive astrocytes were also activated by glutamate (Figure 2D). The second explanation is that astrocytes themselves possess TRP channels, which respond to warming with Ca^{2+} -signals. One likely candidate is TRPV4, a Ca^{2+} -permeable channel which is present in astrocytes and opens upon diverse stimuli including warm temperature or osmotic stimulation [19]. The expression of TRPV4 was demonstrated in 30% of astrocytes in the brain [20]. Stimulated TRPV4-positive astrocytes, in turn, release substances like ATP or glutamate, which exert influence on neurons located in close vicinity [20]. Astrocytes are also targets of various mediators of inflammation, which are involved in the manifestation of the fever [10, 11, 21]. The mixed neuro-glial primary culture of the MnPO could thus, also be used to study the modulation of stimulus-induced activation of astrocytes by substances with pro- or antipyretic properties [10].

For the first time, a specific primary culture of the rat MnPO was used to demonstrate acute responses of neurons to warming and cooling. In addition, a population of astrocytes was identified, which responded to warming with pronounced Ca^{2+} -signals. Employing this culture it will thus be possible to study proposed functions of the MnPO in the regulation of body temperature and other vital homeostatic functions at the cellular level. It will further be possible to investigate proposed or postulated roles of neurotransmitters, neuromodulators, or mediators of inflammation in cellular responses to warming or cooling and thereby to verify or discard previously suggested functions for such substances in thermoregulation that were mainly derived from experiments performed under *in vivo* conditions.

CONFLICTS OF INTEREST

There are no conflicts of interest.

REFERENCES

- 1 Siemens J, Kamm GB. Cellular populations and thermosensing mechanisms of the hypothalamic thermoregulatory center. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 2018; **470**: 809-822.
- 2 Schmid HA, Pierau FK. Temperature sensitivity of neurons in slices of the rat PO/AH hypothalamic area: effect of calcium. *Am J Physiol* 1993; **264**: R440-R448.
- 3 Abe J, Okazawa M, Adachi R, Matsumura K, Kobayashi S. Primary cold-sensitive neurons in acutely dissociated cells of rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 2003; **342**: 29-32.
- 4 Song K, Wang H, Kamm GB, Pohle J, de Castro Reis F, Heppenstall P, Wende H, Siemens J. The TRPM2 channel is a hypothalamic heat sensor that limits fever and can drive hypothermia. *Science* 2016; **353**: 1393-1398.
- 5 Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, Jordt SE, Julius D. The menthol receptor TRPM8 is the principle detector of environmental cold. *Nature* 2007; **448**: 204-208.
- 6 Dhaka QA, Murray AN, Mathur J, Earley TJ, Petrus MJ, Patapoutian A. TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* 2007; **54**: 371-378.
- 7 McKinley MJ, Yao ST, Uschakov A, McAllen RM, Rundgren M, Martelli D. The median preoptic nucleus: front and centre for the regulation of body fluid, sodium, temperature, sleep and cardiovascular homeostasis. *Acta Physiol* 2015; **214**: 8-32.
- 8 Gerstberger R, Barth SW, Horowitz M, Hudl K, Patronas P, Hübschle T. Differential activation of nitrenergic hypothalamic neurons by heat exposure and dehydration. In: *Thermotherapy for Neoplasia, Inflammation and Pain* (Eds. Kosaka M, Sugahara T, Schmidt KL, Simon E), Springer Press Tokyo 2001, pp. 43-62.
- 9 Nakamura K, Morrison S. A thermosensory pathway that controls body temperature. *Nat Neurosci* 2008; **11**: 62-71.
- 10 Roth J, Blatteis CM. Mechanisms of fever production and lysis: Lessons from experimental LPS-fever. *Compr Physiol* 2014; **4**: 1563-1604.
- 11 Simm B, Ott D, Pollatzek E, Murgott J, Gerstberger R, Rummel C, Roth J. Effects of prostaglandin E₂ on cells cultured from the rat *organum vasculosum laminae terminalis* and median preoptic nucleus. *Neuroscience* 2016; **313**: 23-35.
- 12 Soares DM, Ott D, Melo MC, Souza GE, Roth J. Chemokine ligand (CCL)-3 promotes an integrated febrile response when injected within pre-optic area (POA) of rats and induces calcium signaling in cells of POA microcultures but not TNF- α or IL-6 synthesis. *Brain Behav Immun* 2013; **34**: 120-129.
- 13 Nuesslein B, Schmidt I. Development of circadian cycle of core temperature in juvenile rats. *Am J Physiol* 1990; **259**: R270-R276.
- 14 Braun HA, Bade H, Hensel H. Static and dynamic discharge patterns of bursting cold fibers related to hypothetical receptor mechanisms. *Pflügers Arch –Eur J Physiol* 1980; **386**: 1-9.
- 15 Okazawa M, Terauchi T, Shiraki K, Matsumura K, Kobayashi S. 1-Menthol-induced [Ca²⁺]_i increase and impulses in cultured sensory neurons. *Neuroreport* 2000; **11**: 2151-2155.

- 16 Ott D, Simm B, Pollatzek E, Gerstberger R, Rummel C. Prostaglandin D2 modulates calcium signals induced by prostaglandin E2 in neurons of rat dorsal root ganglia. *Neurosci Lett* 2015; **597**: 159-163.
- 17 Wang XP, Yu X, Yan XJ, Lei F, Chai YS, Jiang JF, Yuan ZY, Xing DM, Du LJ. TRPM8 in the negative regulation of TNF α expression during cold stress. *Sci Rep* 2017; **7**: 45155.
- 18 Tabarean IV, Conti B, Behrens M, Korn H, Bartfai T. Electrophysiological properties and thermosensitivity of mouse preoptic and anterior hypothalamic neurons in culture. *Neuroscience* 2005; **135**: 433-449.
- 19 Butenko O, Dzamba D, Benesova J, Honsa P, Benfenati V, Ruskanova V, Ferroni S, Anderova M. The increased activity of TRPV4 channel in the astrocytes of the adult rat hippocampus after cerebral hypoxia / ischemia. *PLoS One* 2012; **7**: 6.
- 20 Shibasaki K, Ikenaka K, Tamalu F, Tominaga M, Ishizaki Y. A novel subtype of astrocytes expressing TRPV4 (transient receptor potential vanilloid 4) regulates neuronal excitability via release of gliotransmitters. *J Biol Chem* 2014; **289**: 14470-14480.
- 21 Soares DM, Santos DR, Rummel C, Rummel C, Ott D, Melo MCC, Roth J, Calixto JB, Souza GEP. The relevance of kalikrein-kini system via activation of B2 receptor in LPS-induced fever in rats. *Neuropharmacol* 2017; **126**: 84-96.

3rd Publication: Effects of gabapentinoids on responses of primary cultures of rat dorsal root ganglia to inflammatory or somatosensory stimulation

prepared for publication

Effects of gabapentinoids on responses of primary cultures from rat dorsal root ganglia to inflammatory or somatosensory stimuli

Stephan Leisengang¹, Daniela Ott¹, Jolanta Murgott¹, Franz Nürnberger¹, Rüdiger Gerstberger¹, Christoph Rummel¹, Martin Schmidt², Joachim Roth¹

¹Department of Veterinary-Physiology and -Biochemistry, Justus-Liebig University, Frankfurter Strasse 100, D-35392 Giessen, Germany

²Department of Veterinary Clinical Sciences, Small Animal Clinic, Justus-Liebig University, Frankfurter Strasse 108, D-35392 Giessen, Germany

Corresponding author:

Dr. Joachim Roth

Department of Veterinary-Physiology and -Biochemistry, Justus-Liebig-University
Giessen

Frankfurter Strasse 100, D-35392 Giessen, Germany

Phone: +49-641 - 99 - 38150

Fax: +49-641 - 99 - 38159

E-mail: joachim.roth@vetmed.uni-giessen.de

ABSTRACT

Gabapentinoids are known to reduce neuropathic pain. The aim of this experimental study was to investigate whether gabapentinoids exert anti-inflammatory and / or anti-nociceptive effects at the cellular level using primary cell cultures of rat dorsal root ganglia (DRG). Cells from rat DRG were cultured in presence of gabapentin or pregabalin and we tested the effects of subsequent stimulation with LPS on the expression of genes (real-time RT-PCR) and production of TNF α and IL-6. Using Ca²⁺-imaging we further investigated the effects of gabapentinoids upon nociceptive stimulation with capsaicin. There is an influence of gabapentinoids on the inflammatory response to LPS-stimulation, namely a significantly reduced expression of IL-6 and a moderate inhibitory effect on mPGES-1 expression. Pregabalin and Gabapentin further seem to exert a moderate influence on capsaicin-induced Ca²⁺-signals in DRG neurons. Although the single effects of gabapentinoids on inflammatory and nociceptive responses are moderate, a combination of both effects might provide an explanation for the reduction of neuropathic pain caused by these substances.

Key words: dorsal root ganglia, gabapentinoids, lipopolysaccharide, cytokines, calcium imaging

INTRODUCTION

Gabapentinoids such as gabapentin or pregabalin are drugs for reducing neuropathic pain (Alles & Smith, 2017). These substances were originally designed as analogs of the inhibitory neurotransmitter γ -aminobutyric acid (GABA), but their effects on GABA neurotransmission could not be proven (Lanneau et al., 2001). The search for mechanisms of the analgesic effects exerted by gabapentinoids then focused on voltage-dependent Ca^{2+} -channels, namely their $\alpha_2\delta$ -1 subunit (Field et al., 2006). Binding of gabapentioids to this subunit seems to disrupt the trafficking of Ca^{2+} -channels when administered chronically and thereby reduces the function of these channels within the nociceptive pathway (Hendrich et al., 2008). More recently, an alternative mechanism for the anti-nociceptive effect of gabapentinoids was suggested. Some studies provided evidence that gabapentin has anti-inflammatory capacities by reducing the stimulus-induced expression of mediators of inflammation (Dias et al., 2014; Anfuso et al., 2017) or by increasing the expression of mediators with established anti-inflammatory properties (Bao et al., 2014). These effects of gabapentinoids were discussed as putative mechanism of how these drugs might reduce pain under inflammatory conditions since inflammation is often associated with neuropathic pain (Hutchinson et al., 2013).

We recently characterized and used a primary culture of rat dorsal root ganglia (DRG) to study effects of somatosensory or inflammatory stimulation on the cellular elements of this culture (Leisengang et al., 2018). The majority of the DRG neurons are putative nociceptors and are equipped with the pain-sensing channel TRPV-1 of the transient receptor potential (TRP) channel family (Caterina & Julius, 2001). The TRPV-1 channel responds to capsaicin, an active component of chili pepper, with a pronounced increase of the intracellular concentration of Ca^{2+} . This approach can be used to characterize modulation of pain-induced signals at the cellular level. DRG primary cultures further consist of satellite glial cells and a moderate number of cells of the macrophage-monocyte lineage (Leisengang et al., 2018). These cell types produce mediators of inflammation upon stimulation with lipopolysaccharide (LPS). In the present study we investigated whether cultivation of DRG in the presence of gabapentinoids caused modified expressions of relevant mediators of inflammation, TRPV-1 channels or the $\alpha_2\delta$ -1 subunit of voltage-dependent Ca^{2+} -channels. We further evaluated capsaicin-induced Ca^{2+} -

responses under the influence of the presence of gabapentin or pregabalin in the culture medium. We provide evidence for a moderate influence of both gabapentinoids on the inflammatory response to LPS-stimulation, namely a reduced expression of interleukin-6 (IL-6). We further report a tendency for reduced percentages of capsaicin-responsive nociceptive neurons under the influence of pregabalin.

MATERIALS AND METHODS

Preparation and cultivation of DRG cells

For all experiments we used 4-6 week old Wistar rats of both sexes obtained from an in-house breeding colony. Parent animals originated from Charles River WIGA (Sulzfeld, Germany). Animal care, breeding and experimental procedures were conducted according to the guidelines approved by the Hessian Ethical Committee (approval numbers GI 468_M and GI 487_M). The room temperature was constantly kept at 22 ± 1 °C and relative humidity at 50%. From 7:00 AM to 7:00 PM artificial lights were on.

For each experiment two rats were anesthetized with CO₂ and killed by cervical dislocation. The vertebral column was opened lengthwise and DRG from both sides were extracted aseptically and collected in Petri dishes filled with cold, oxygenated GBSS (Gey's Balanced Salt Solution; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) containing 0.5% D-glucose (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany). After isolation DRG were cleaned and transferred into oxygenated HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, without Ca²⁺ and Mg²⁺; Biochrom GmbH, Berlin, Germany) supplemented with 20 mM HEPES (Sigma Aldrich Chemie GmbH) at pH 7.4. About 20 DRG per animal were collected. After enzymatical digestion the DRG were dissociated, washed and resuspended with a cell number of 75,000 cells / ml. Afterwards the cells were cultured in Neurobasal A medium (Life Technologies GmbH, Darmstadt Germany) on poly-L-lysine coated glass coverslips as previously described (Ott et al., 2015, Leisengang et al., 2018).

Four hours after plating the medium was replaced by medium containing gabapentin (100 μ M, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) or pregabalin (100 μ M, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) or phosphate buffered saline (PBS, Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfer Grund, Germany) as control. The doses were chosen according to pilot experiments and published data (Biggs et al., 2014, Rock et al., 1993, McClelland et al., 2004).

Stimulation experiments

After 18 h of cultivation in medium containing gabapentin, pregabalin or PBS, the medium was removed and the cells were incubated with lipopolysaccharide (LPS; 10 μ g/ml; Sigma Aldrich Chemie GmbH) or PBS in complete medium also containing the respective drug for 120 min in a humidified atmosphere of 5% CO₂ / 95% air at 37 °C. After incubation the supernatants of stimulated cell cultures were collected and stored at -45 °C for later determination of cytokines, while the cells were used for real-time PCR.

Real-time RT-PCR

In 3-5 independent experiments we performed RT-PCR to investigate the expression of different target genes, related to putative gabapentinoid effects. For each experiment, 48 wells with DRG cells were prepared as described above. 16 wells per group were incubated with medium containing gabapentin, pregabalin or PBS for 18 hours. 8 wells from each group were then additionally stimulated with LPS (10 μ g/ml), the other 8 wells with PBS for 2 h. After collection of all supernatants, cells were washed with PBS and afterwards all cells of one group were lysed in 200 μ l RA1-buffer from the NucleoSpin^R RNA XS Kit (Macherey Nagel, Düren, Germany). RNA was extracted according to the manufacturer's protocol and RNA concentrations of all samples were equalized to 25 ng/ μ l. Reverse transcription of about 200 ng total RNA was performed using 50 U murine leukemia virus reverse transcriptase, 50 μ M random hexamers, and 10 mM deoxynucleoside triphosphates (dNTP) mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), in a total reaction volume of 20 μ l. Quantitative real-time PCR was performed in duplicates using a pre-optimized primer/probe mixture (TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and TaqMan universal PCR Master Mix

(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The following cycling protocol was used: polymerase activation, 50 °C for 2 minutes, denaturation, 95 °C for 10 minutes and 40 cycles of 15 seconds denaturation at 95 °C followed by 1 minute of annealing and elongation at 60 °C.

For normalization of cDNA quantities the reference gene β actin (4352340E, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used (Harden et al., 2014; Schweighöfer et al., 2016; Leisengang et al., 2018). The sample values for each gene represent x-fold difference from a control sample (given as a designated value of 1 within the same experiment). The following gene expression assays from Applied Biosystems were used:

TNF α Rn99999017_m1, IL-6 Rn01410330_m1, COX-2 Rn00568225_m1, mPGES-1 Rn00572047_m1, TRPV1 Rn00583117_m1, calcium channel alpha2/delta subunit 1 Rn01442580_m1.

Cytokine measurements

Highly sensitive bioassays, which are capable to detect rather low amounts of TNF α and IL-6, were employed to measure both cytokines. International standards (murine TNF code 88/532 and human IL-6 code 89/548, National Institute for Biological Standards and Control, South Mimms, UK) were used to calibrate the assays. The bioassays are based on the specific cytotoxic effect of TNF α on the mouse fibrosarcoma cell line WEHI 164 subclone 13 and the dose-dependent growth stimulation of IL-6 on the B9 hybridoma cell line (For details on both assays see: Knorr et al., 2008, Welsch et al., 2012).

Measurement of intracellular calcium

After 18 hours of cultivation in medium containing gabapentin, pregabalin or PBS, cells were loaded with 2 μ M fura-2-AM (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) in complete medium containing the respective drug for 45 min in a humidified atmosphere of 5% CO₂ / 95% air at 37 °C. To measure intracellular Ca²⁺-levels, coverslips with DRG cultures were placed under an inverted microscope (IMT-2; Olympus GmbH, Hamburg, Germany) in a specially constructed Teflon® culture chamber. During all experiments cells were superfused with Ca²⁺-imaging buffer (Ott et al., 2015), at pH 7.4 with a flow

rate of 2.0 ml/min and at constant temperature of 36 °C. Fluorescence measurements were performed using a filterwheel-based excitation system and analyzed with MetaFluor 7.7.8.0 software (Visitron GmbH, Puchheim, Germany). Regions of interest were defined for every single cell and the emitted fluorescence (>515 nm) after alternating excitations at 340 and 380 nm, respectively, was recorded over time by a Spot Pursuit digital CCD-camera (Model 23.0, Visitron GmbH). The 340/380 nm ratios were registered and analyzed. The drugs used as distinct stimuli were stored as stock solutions of gabapentin (10 mM in H₂O), pregabalin (10 mM in H₂O), PGE₂ (Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Germany; 1 mM in Ca²⁺-imaging buffer), menthol (Sigma Aldrich Chemie GmbH; 100 mM in ethanol) and capsaicin (Sigma Aldrich Chemie GmbH; 10 mM in DMSO) at -20 °C. The working dilutions of 100 µM gabapentin, 100 µM pregabalin, 10 µM PGE₂, 100 µM menthol and 1 µM capsaicin were diluted in Ca²⁺-imaging buffer just prior to the experiments. The applied doses were selected due to preliminary recordings from pilot studies, in which several doses were tested (see also: Leisengang et al., 2018). Buffer containing “high potassium concentration” (50 mM KCl) was used as vitality test for neurons, resulting in an increase of intracellular calcium in all neurons. Drugs were administered to the recording chamber via superfusion at 2.0 ml/min for 3 minutes. In each experiment five distinct stimuli were used (Gabapentin / Pregabalin / PBS, menthol, PGE₂, KCl, capsaicin). The respective drug was present during the whole experiment. Washing periods between distinct stimuli lasted 6 minutes. Capsaicin was always applied as the last stimulus of a given experiment because DRG neurons show signs of desensitization or even degeneration after being exposed to capsaicin (Caterina & Julius, 2001; Passmore, 2005).

Evaluation and statistics

The difference between resting [Ca²⁺]_i measured prior to the respective stimulation and the stimulus-induced [Ca²⁺]_i peak was expressed as stimulus-induced transient increase (Δ ratio [340/380 nm]). A Δ ratio [340/380 nm] larger than 0.05 was considered to be a stimulus-induced Ca²⁺-signal. Numbers of neurons, showing an increase of intracellular calcium as a response to a defined stimulus, are presented as absolute numbers and percentages of all investigated neurons.

The Δ ratio values, concentrations of cytokines in the supernatants and relative expressions of mRNA were presented as means \pm standard error of the mean (SEM) and compared by a one- or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post-test. The software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., LaJolla, CA, USA) was used for analysis and creation of artwork.

RESULTS

Responses of DRG primary cultures to inflammatory stimulation after cultivation with gabapentin, pregabalin or PBS

In a first experiment we analyzed the expression of important inflammatory target genes, like the cytokines TNF α and IL-6 and the enzymes COX-2 and mPGES-1, which are involved in the inflammation-induced PGE₂-synthesis, by means of RT-PCR. Beside these genes, we investigated the expression of the TRPV-1 channel and the $\alpha_2\delta$ -1 subunit of voltage-dependent Ca²⁺-channels, which are important for the perception and transmission of nociceptive stimuli and possible targets for therapeutical interventions.

Stimulation with LPS (10 μ g/ml) led to highly significant increases in the expression of the cytokines TNF α and IL-6 in all experimental groups [Fig. 1 A+B]. Cultivation in presence of gabapentin or pregabalin significantly attenuated the LPS-induced increase of IL-6 expression compared to the control group [Fig. 1 B]. The expression of COX-2 and mPGES-1 was enhanced in LPS-stimulated DRG cells [Fig. 1 C+D]. A significant increase for mPGES-1, seen in the control group, was reduced in gabapentin and missed in pregabalin treated groups [Fig. 1 D]. The tendency for an enhanced expression of TRPV-1 in LPS-stimulated controls failed to reach a level of statistical significance (PBS: 1.49 ± 0.22 vs, LPS: 2.13 ± 0.26 , $p = 0.0984$) [Fig. 1 E]. Such a tendency was not observed in cells cultured in presence of gabapentin or pregabalin.

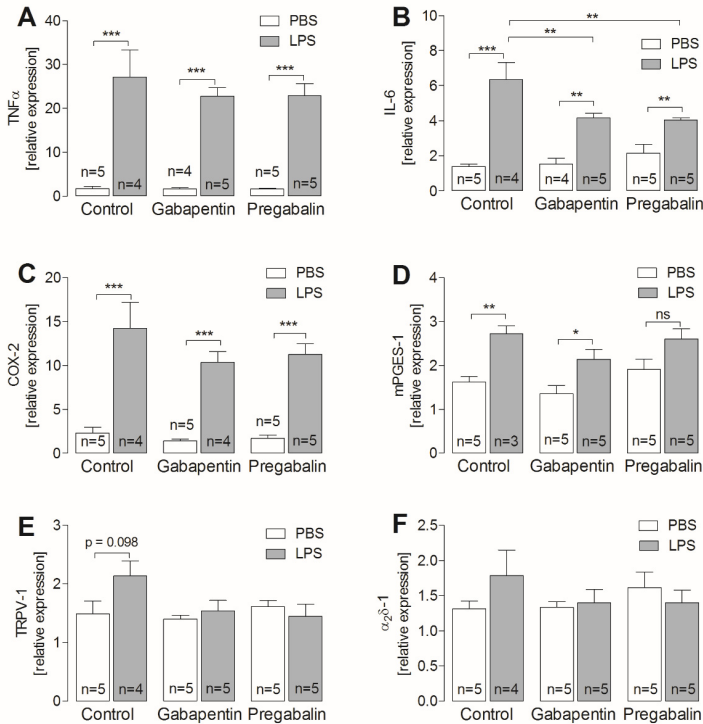


Figure 1:

After 18 hours of incubation in presence of PBS (Control), gabapentin or pregabalin the medium was replaced by medium supplemented with PBS or LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) in addition to the respective drug. After 2 hours of stimulation, the medium was removed and cells were lysed to perform RT-PCR. Columns represent the mean \pm SEM of 3-5 independent experiments. The expression of a target gene in each probe was determined in duplicates. Stimulation with LPS lead to significant increases in the relative expression of $\text{TNF}\alpha$, IL-6 and COX-2 in all experiments (A - C). Pretreatment with gabapentinoids reduced this LPS-induced increase of IL-6 expression significantly (B). A significantly enhanced expression of mPGES-1 was reduced in gabapentin and missed in pregabalin pretreated groups. The tendency of an enhanced expression of TRPV-1 after 2 hours of LPS stimulation was exclusively observed in the control group, not in the gabapentin and pregabalin pretreated groups.

[*: significant difference: $p < 0.05$, **: significant difference: $p < 0.01$, ***: significant difference: $p < 0.001$]

From the same DRG primary cultures we collected supernatants and determined the release of the cytokines TNF α and IL-6 by means of highly specific bioassays. An incubation of DRG cultures with LPS for 120 minutes resulted in a highly significant increase of TNF α release in all experiments (Control PBS: 90.77 ± 9.1 vs Control LPS: 354.8 ± 31.97 , Gabapentin PBS: 88.91 ± 10.69 vs Gabapentin LPS: 298.1 ± 28.56 , Pregabalin PBS: 86.0 ± 7.47 vs Pregabalin LPS: 343.9 ± 31.27) [Fig. 2 A]. A significant effect of cultivation in medium containing gabapentin or pregabalin on TNF α release could not be detected. IL-6 concentrations in the supernatants were significantly increased after stimulation with LPS (Control PBS: 23.08 ± 3.31 vs Control LPS: 158.6 ± 13.45 , Gabapentin PBS: 29.27 ± 4.31 vs Gabapentin LPS: 164.7 ± 11.96 , Pregabalin PBS: 31.5 ± 4.22 vs Pregabalin LPS: 140.7 ± 11.76). Incubation with gabapentinoids had no significant effect on IL-6 release at this point of time.

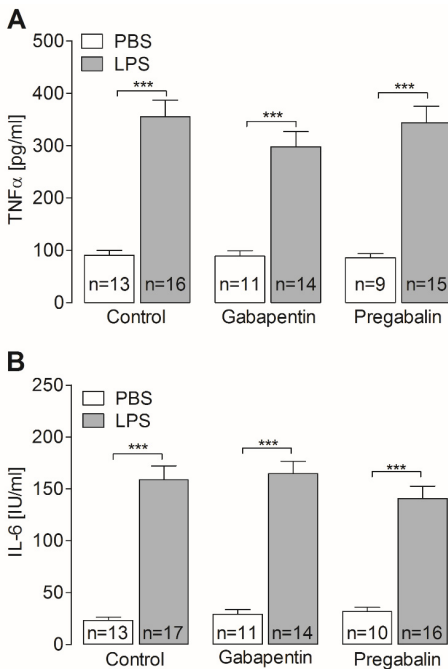


Figure 2:

Cell cultures were incubated with medium containing PBS (Control), gabapentin or pregabalin for 18 hours and thereafter stimulated with fresh medium containing PBS or LPS (10 μ g/ml) in addition to the respective drug. After 2 hours of stimulation the medium was collected for measurements of TNF α - and IL-6-concentrations by means of specific bioassays. Bars represent mean \pm SEM. Stimulation with LPS resulted in highly significant increases in concentrations of both cytokines in all groups without significant effects of preincubation with gabapentin or pregabalin.

[***: significant difference: $p < 0.001$]

Effects of gabapentinoids on stimulus-induced Ca^{2+} -signals in neurons of DRG primary cultures

In another series of experiments, we investigated the effect of cultivation of DRG neurons in medium containing gabapentin or pregabalin or PBS on responses to distinct neurochemical stimuli by means of Ca^{2+} -imaging. The respective gabapentinoid or PBS was also present during the respective stimulations. To exclude that gabapentinoids themselves lead to an increase of intracellular calcium $[\text{Ca}^{2+}]_i$, they were admitted first as internal control. Not a single neuron showed a change of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ due to this stimulus. As a second stimulus we tested PGE_2 (not shown), which led to an increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in 5 of 57 neurons of the control group, 5 of 60 neurons in the gabapentin group, and 2 of 74 neurons in the pregabalin group. Stimulation with the TRPM-8 agonist menthol resulted in an increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in 15.8% of the neurons in the control group (9 of 57), while 17.2% of the gabapentin-treated (10 of 58) and 13.5% of the pregabalin-treated neurons (10 of 74) were responsive to menthol [Fig. 3]. Regarding the strength of menthol-induced Ca^{2+} -signals there were no significant differences between the groups.

46 of 57 investigated neurons in the control group (80.7%) responded to stimulation with capsaicin, a TRPV-1 agonist, with an increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$. After cultivation in medium containing gabapentin, 75.9% of the neurons were responsive to capsaicin (44 of 58). In the third group, pretreated with pregabalin, the number of capsaicin-responsive neurons was reduced to 68.9% (51 of 74) [Fig. 3].

In cell cultures pre-treated with gabapentin or pregabalin, we observed, that some neurons showed remarkably smaller or larger responses to the capsaicin-stimulus compared to the respective KCl-response of the same cell. We therefore analyzed the percentages of $[\Delta\text{ratio capsaicin} / \Delta\text{ratio KCl}]$. In the control group all investigated neurons showed similar responses to capsaicin and KCl ($109.2\% \pm 1.99$, mean \pm SEM) [Fig. 4A, grey dots]. In cell cultures pre-treated with one of the gabapentinoids there was a number of neurons responding to capsaicin with only 20-80% compared to its KCl-response [Fig. 4A, gabapentin = green squares, pregabalin = blue triangles]. These neurons represent a subpopulation of 16.1%, cultured in presence of gabapentin (5 of 31), and 16%, cultured in presence of pregabalin (4 of 25). Three examples are shown in Figure 4B, corresponding to red arrows in Figure 4A. There was also a small subpopulation of neurons in the gabapentinoid pretreated groups showing markedly higher capsaicin-

responses compared to the respective KCl-response. This enhanced distribution is represented in an increased standard error of the mean (Control: $109.2\% \pm 1.99$, Gabapentin: $103.4\% \pm 5.1$, Pregabalin: $106.9\% \pm 9.55$) [Fig. 4]. For these results, only neurons returning to their baselines after the preceding KCl stimulation were included.

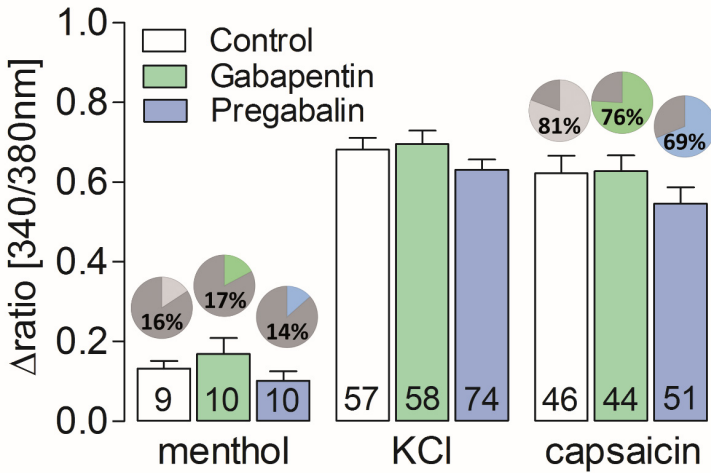


Figure 3:

After incubation with PBS (Control), gabapentin or pregabalin for 18-24 hours, DRG primary cultures were used for intracellular calcium measurements.

Bars represent the mean difference of the intracellular calcium level (Δ ratio [340/380 nm]) \pm SEM of all responsive neurons in response to a distinct stimulus (menthol, KCl, capsaicin). Numbers in bars represent the absolute numbers of neurons with a Δ ratio larger than 0.05. Diagrams above each bar show the percentages of responsive neurons in relation to all vital neurons. Treatment with pregabalin reduced the percentage of neurons responding to capsaicin (69%), compared to the control group (81%).

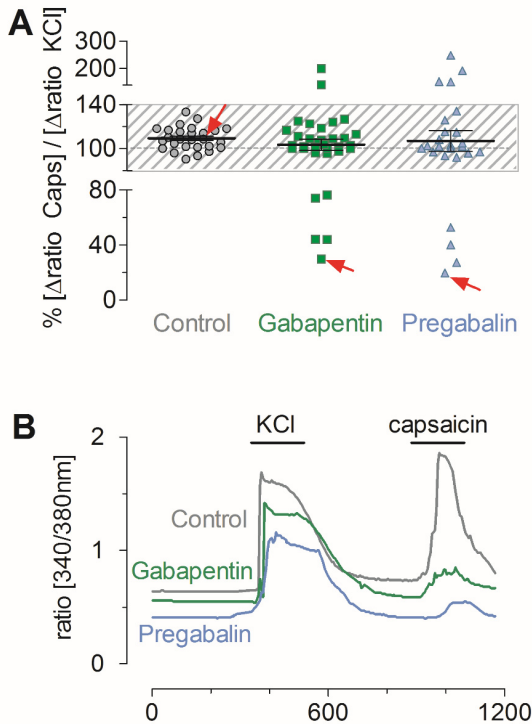


Figure 4:

Incubation of DRG primary cultures in medium containing gabapentinoids resulted in changes in their response to capsaicin compared to their KCl-response. In PBS treated cultures capsaicin and KCl caused similar increases of intracellular calcium ($\Delta \text{ratio capsaicin} / \Delta \text{ratio KCl}$ between 80% and 140% (grey shaded background) with a mean of $109.2\% \pm 1.99$. Treatment with gabapentin or pregabalin resulted in an increased distribution (Gabapentin: $103.4\% \pm 5.1$, Pregabalin: $106.9\% \pm 9.55$), with single neurons responding to capsaicin with an increase of only 20% of the respective KCl response. An example for each group is shown in Fig. 4B, corresponding to red arrows in Fig. 4A. For this evaluation only neurons returning to their previous baselines after KCl stimulation were included.

DISCUSSION

In this study, we tested the responses of an established primary culture from rat dorsal root ganglia to inflammatory (LPS) or somatosensory (capsaicin) stimulation in presence or absence of gabapentinoids in the culture medium. Some papers reported that treatment of animals with gabapentinoids resulted in reduced formation of several inflammatory mediators in experimental models of endotoxin-induced uveitis (Anfuso et al., 2017), neuropathic pain (Bao et al. 2014), or carrageenan-induced paw edema (Dias et al., 2014). Regarding the cytokines (TNF α , IL-6) and the inducible enzymes for the formation of prostaglandin E₂ (COX-2, mPGES-1), we just observed a tendency for reduced LPS-induced expression of mPGES-1 by rat DRG primary cultures in presence of gabapentinoids. LPS-induced expression of IL-6, on the other hand, was significantly reduced by the presence of gabapentin or pregabalin in the culture medium [Fig. 1]. This observation is relevant in so far, as IL-6 seems to influence peripheral sensory nerves in a direction that promotes the manifestation of inflammatory / neuropathic pain (Andratsch et al., 2009; Fang et al., 2015). As shown by Fang et al. (2015) the contribution of IL-6 to pain manifestation is mediated by the increased expression of the capsaicin receptor TRPV-1 under the influence of this cytokine. In line with this report, the tendency for an increase of LPS-induced expression of TRPV-1 was exclusively observed in absence of gabapentinoids [Fig. 1]. In contrast to the expression of IL-6, we could not demonstrate a significant reduction of the LPS-induced release of bioactive IL-6 into the supernatants of our cultures [Fig. 2]. A possible reason for this discrepancy might be a delayed effect of gabapentinoids on the formation of IL-6 at the protein compared to the mRNA level. We assume that gabapentinoids have a moderate influence on the inflammatory response of DRG primary cultures due to LPS-stimulation.

The strength of stimulus-induced Ca²⁺-signals can be used to evaluate a modulation of nociceptive responses of DRG neurons to capsaicin by selected pre-treatments. In a previous study, for example, we showed that cultivation of DRG neurons in presence of LPS resulted in enhanced capsaicin-induced Ca²⁺-responses (Leisengang et al., 2018). Here we aimed to test whether capsaicin-induced Ca²⁺-signals might be reduced by gabapentinoids. The presence of gabapentin and especially of pregabalin in the culture medium caused a reduction of the percentage of activated neurons in response to capsaicin

[Fig. 3]. The variation of cellular responses due to a stimulation with capsaicin compared to each KCl response was increased, with subpopulations of neurons responding with much smaller or even larger peaks. It is thus rather speculative to postulate direct inhibitory effects of gabapentinoids on the TRPV-1 channels as a putative mechanism to explain the reported anti-allodynic effects of gabapentinoids, although such effects might operate in small subpopulations of nociceptive neurons [Fig. 4].

Indeed, the precise mechanisms of action of gabapentinoids seem to be of multiple additive origin and are therefore difficult to characterize and demonstrate (Sills, 2006; Alles and Smith, 2017). Still, our results provide some modest evidence for anti-inflammatory and thereby anti-nociceptive capacities of these substances in an experimental *in vitro* model of primary cell cultures from dorsal root ganglia.

REFERENCES

Andratsch M, Mair N, Constantin CE, Scherbakov N, Benetti C, Quarta S, Vogl C, Sailer CA, Üceyler N, Brockhaus J, Martini R, Sommer C, Zeilhofer HU, Müller W, Kuner R, Davis JB, Rose-John S, Kress M (2009) A key role for gp130 expressed on peripheral sensory nerves in pathologic pain. *J Neurosci* 29: 13473-13483.

Alles SRA, Smith PA (2017), The anti-allodynic gabapentinoids: myths, paradoxes, and acute effects. *Neuroscientist* 23: 40-55.

Anfuso CD, Olivieri M, Fidilio A, Lupo G, Rusciano D, Pezzino S, Gagliano C, Drago F, Buculo C (2017) Gabapentin attenuates ocular inflammation: *in vitro* and *in vivo* studies. *Front Pharmacol* 8: 173.

Bao Y-H, Zhou Q-H, Chen R, Xu H, Zeng L-L, Zhang X, Jiang W, Du D-P (2014) Gabapentin enhances the morphine anti-nociceptive effect in neuropathic pain via the interleukin-10-heme oxygenase-1 signalling pathway in rats. *J Mol Neurosci* 54: 137-146.

Biggs JE, Boakye P, Ganesan N, Stemkowski PL, Lantero A, Ballanyi K, Smith PA (2014) Analysis of the long-term actions of gabapentin and pregabalin in dorsal root ganglia and substantia gelatinosa, *J Neurophysiol* 112: 2398-2412

Caterina MJ, Julius D (2001), The vanilloid receptor: A molecular gateway to the pain pathway. *Ann Rev Neurosci* 24: 487-517.

Dias JM, Vieira de Brito T, de Aquiar Magalhaes D, da Silva Santos PW, Batista JA, do Nascimento Dias EG, de Barros Fernandes H, Rodrigues Bonfim Damasceno S, Silva RO, Aragao KS, Souza MHL, Medeiros J-V R, Barbosa ALR (2014) Gabapentin, a synthetic analogue of gamma aminobutyric acid, reverses systemic acute inflammation and oxidative stress in mice. *Inflammation* 37: 1826-1836.

Field MJ, Cox PJ, Stott E, Melrose H, Offord J, Su T-Z, Bramwell S, Corradini L, England S, Winks J, Kinloch RA, Hendrich J, Dolphin AC, Webb T, Williams D (2006) Identification of the $\alpha_2\text{-}\delta\text{-}1$ subunit of voltage-dependent calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 17537-17542.

Fang D, Kong LY, Cai J, Li S, Liu XD, Han JS, Xing GG (2015) Interleukin-6-mediated functional upregulation of TRPV1 receptors in dorsal root ganglion neurons through the activation of JAK/PI3K signalling pathway: roles in the development of bone cancer pain in a rat model. *Pain* 156: 1124-1144.

Harden LM, Rummel C, Laburn HP, Damm J, Wiegand F, Poole S, Gerstberger R, Roth J (2014) Critical role for peripherally-derived interleukin-10 in mediating the thermoregulatory manifestations of fever and hypothermia in severe forms of lipopolysaccharide-induced inflammation. *Pflugers Archiv – European Journal of Physiology* 466, 1451-1466.

Hendrich J, Van Minh AT, Hebllich F, Nieto-Rostro M, Watschinger K, Striessnig J, Wratten J, Davies A, Dolphin AC (2008) Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the $\alpha_2\delta$ ligand gabapentin. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 3628-3633.

Hutchinson MR, Buijs M, Tuke J, Kwok YH, Gentgal MI, Williams D, Rolan P (2013) Low-dose endotoxin potentiates capsaicin-induced pain in man: Evidence for a pain neuroimmune connection. *Brain Behav Immun* 30: 3-11.

Knorr C, Hübschle T, Murgott J, Mühlradt P, Gerstberger R, Roth J (2008) Macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) induces a localized inflammatory response in rats resulting in activation of brain sites implicated in fever. *Brain Res* 1205: 36-46.

Lanneau C, Green A, Hirst WD, Wise A, Brown JT, Donnier E, Charles KJ, Wood M, Davies CH, Pangelos MN (2001) Gabapentin is not a GABA_B receptor agonist. *Neuropharmacology* 41: 965-975.

Leisengang S, Ott D, Murgott J, Gerstberger R, Rummel C, Roth J (2018) Primary cultures from rat dorsal root ganglia: responses of neurons and glial cells to somatosensory or inflammatory stimulation. *Neuroscience* 394: 1-13.

McClelland D, Evans RM, Barkworth L, Martin DJ, Scott RH (2004) A study comparing the actions of gabapentin and pregabalin on the electrophysiological properties of cultured DRG neurones from neonatal rats, *BMC Pharmacology* 4: S.14

Ott D, Simm B, Pollatzek E, Murgott J, Gerstberger R, Rummel C, Roth J (2015) Prostaglandin D2 modulates calcium signals induced by prostaglandin E2 in neurons of rat dorsal root ganglia. *Neuroscience Letters* 597: 159-163.

Passmore GM (2005) Dorsal root ganglion neurones in culture: A model system for identifying novel analgesic targets. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 51: 201-208.

Rock DM, Kelly KM, Macdonald RL (1993) Gabapentin actions on ligand- and voltage-gated responses in cultured rodent neurons, *Epilepsy Research* 16: 89-98

Schweighöfer H, Rummel C, Roth J, Rosengarten B (2016) Modulatory effects of vagal stimulation on neurophysiological parameters and the cellular immune response in the rat brain during systemic inflammation. *Intensive Care Medicine Experimental* 4: 19.

Sills GJ (2006) The mechanisms of action of gabapentin and pregabalin. *Current Opinion in Pharmacology* 6: 108-113.

Welsch J, Hübschle T, Murgott J, Kirschning C, Rummel C, Gerstberger R, Roth J (2012) Fever induction by systemic stimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 depends upon TLR2 but not CD36. *Innate Immunity* 18: 541-559.

D. ERWEITERTE DISKUSSION

Die im Abschnitt C dargestellten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Primärzellkulturen von Spinalganglien bestehen hauptsächlich aus Neuronen (ca. 10%), Satellitenglia-Zellen (ca. 80%) und einem geringen Anteil ortsständiger Makrophagen (ca. 1%).
- Neurone der Kultur reagieren auf thermische und chemische Stimuli mit einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration:
 - Capsaicin: 75% der Neurone
 - Menthol: 10% der Neurone
 - PGE₂: 4% der Neurone
- Nach inflammatorischer Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS: 1 µg/ml für 18h) kommt es zu einer gesteigerten Calcium-Antwort auf Capsaicin und zu einer erhöhten Anzahl warm-responsiver Neurone (Sensibilisierung).
- Durch die inflammatorische Stimulation mit LPS (1 µg/ml für 18h bzw. 10 µg/ml für 2h) steigt die Konzentration der Zytokine TNFα und IL-6 in den Überständen an. Auf mRNA Ebene lässt sich mittels RT-PCR eine gesteigerte Genexpression der beiden Zytokine beobachten. Daneben kommt es zu einem Anstieg der Expression von Cyclooxygenase-2, welche für die PGE₂-Synthese von Bedeutung ist.
- Immunzytochemisch lässt sich TNFα nach LPS-Stimulation vermehrt in Makrophagen der Kultur im so genannten *trans*-Golgi-Netzwerk auffinden.
- Nach LPS-Stimulation ist eine verstärkte nukleäre Translokation der inflammatorischen Transkriptionsfaktoren STAT3 und NF-IL6 in Neuronen nachweisbar. NF-IL6 zeigt daneben auch ein deutlich verstärktes Signal in Makrophagen.
- Die Reduktion der Anzahl an Makrophagen und Unterdrückung des Wachstums von Satellitenglia-Zellen durch Cisplatin führt zu einer Abnahme der LPS induzierten Zytokinexpression und -freisetzung. Die durch LPS induzierte Verstärkung der Ca⁺⁺-Antwort von Nozizeptoren ist durch den Einsatz von Cisplatin vermindert.

- Gabapentinoide (Gabapentin und Pregabalin) führen zu verringerten Ca^{++} -Antworten einzelner Neurone auf Capsaicin. Zudem zeigen prozentual weniger Neurone nach Einsatz von Gabapentin bzw. Pregabalin eine Ca^{++} -Antwort auf diesen Stimulus (Control: 81%, Gabapentin: 76%, Pregabalin: 69%).
- Der Einsatz von Gabapentin bzw. Pregabalin führte zu einer verminderten Interleukin-6 Genexpression nach LPS-Stimulation. Daneben ist die Tendenz einer durch LPS induzierten gesteigerten Genexpression von TRPV1 nach Vorstimulation mit Gabapentinoiden nicht mehr nachweisbar.
- Im *Nucleus preopticus medianus* (MnPO) lässt sich eine kleine Population Kälte-responsiver Zellen (2%) finden. Auf einen Wärme-Stimulus zeigen etwa 7,5% der Neurone sowie 9,5% der Astrozyten einen deutlichen Anstieg der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration.
- Keines der Wärme-responsiven hypothalamischen Neurone zeigt eine Zellantwort auf Capsaicin. Es handelt sich dabei um physiologische Warmsensoren.

1. Einfluss thermischer und chemischer Stimuli auf Primärzellkulturen von Spinalganglien (DRG)

In den Spinalganglien befinden sich die Zellkörper der Neurone, welche die freien Nervenendigungen in der Körperperipherie ausbilden. Darüber hinaus existieren hier Satellitenglia-Zellen, die hauptsächlich eine Versorgungs- und Stützfunktion haben und die Neurone direkt umgeben. Sie sind allerdings auch in der Lage, Substanzen aus der Umgebung aufzunehmen sowie neuromodulatorische Mediatoren abzugeben (Hanani 2005). Daneben sorgen insbesondere ortsständige Makrophagen für die Bildung und Freisetzung von inflammatorisch bedeutsamen Mediatoren (Hu und McLachlan 2003; Mueller et al. 2001). Primärzellkulturen von Spinalganglien eignen sich zur Untersuchung thermischer und chemischer Stimuli auf sensorische Neurone mittels Elektrophysiologie und Calcium-Imaging (Malin et al. 2007; Passmore 2005). Dazu zählen sowohl Temperatur-, als auch Schmerz-sensitive Nervenzellen, welche in der vorliegenden Studie untersucht worden sind. In einer ersten Serie von Versuchen konnte

gezeigt werden, dass etwa 75% der Neurone (317/423) in den verwendeten Primärkulturen von Spinalganglien auf Capsaicin, einen Agonisten am TRPV1, mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration reagierten. Durch Capsaicin aktivierte sensorische Neurone lassen sich allgemein als Nozizeptoren charakterisieren (Caterina et al. 2000; Lu et al. 2006; Frias und Merighi 2016). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit denen anderer Studien, bei denen eine ähnliche (77%; Sculptoreanu et al. 2010) bzw. etwas geringere Anzahl (64%; Gold et al. 1996a) von Nozizeptoren in Primärkulturen von Spinalganglien beschrieben wurde. Unter den Capsaicin-responsiven Neuronen befanden sich auch einige Neurone (33%; 36/109), welche zusätzlich auf einen Wärme-Stimulus (45 °C) mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration reagierten. Alle warm-responsiven Neurone zeigten dabei auch eine Zellantwort auf Capsaicin, weswegen es sich um Nozizeptoren und nicht um physiologische Warmsensoren handelt. Physiologische Warmsensoren werden bereits bei geringeren Temperaturen aktiviert und als verantwortlicher Rezeptor wurde kürzlich der TRPM2-Kanal identifiziert (Tan und McNaughton 2016; Song et al. 2016). Kirschstein et al. untersuchten dissoziierte Spinalganglien-Neurone mit Hilfe der Patch-clamp-Technik ebenfalls auf deren Wärme- und Capsaicin-Responsivität, und fanden dabei heraus, dass 31% (8/26) der Neurone auf einen Wärme-Stimulus reagieren und alle diese warm-responsiven Neurone auch eine Reaktion auf Capsaicin zeigen (Kirschstein et al. 1997). Auch in anderen Studien wurde nachgewiesen, dass zumindest ein Großteil der warm-responsiven Neurone aus Spinalganglien auch auf Capsaicin reagiert (97%, 32/33; (Savidge et al. 2001).

Daneben wurde in der vorliegenden Studie auch die Responsivität von Neuronen auf Kälte und Menthol, einen Agonisten am TRPM8, untersucht. Dadurch wurden mögliche Kältesensoren identifiziert (Braun et al. 1980; Schäfer et al. 1986; Peier et al. 2002). Dabei zeigten 10% der untersuchten Neurone (42/426) einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration auf den Menthol-Stimulus, worunter sich auch Kälte-responsive Neurone befanden (3%, 13/426). Auch diese Ergebnisse lassen sich gut mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen vergleichen, bei denen 10% (Okazawa et al. 2000) bzw. 11% (Reid et al. 2002) der Neurone auf Menthol reagierten. Auch in den Untersuchungen von Reid et al. zeigten nicht alle Menthol-responsiven Neurone eine Zellantwort auf Kälte.

Zusätzlich wurde die Responsivität der Neurone auf Prostaglandin E_2 untersucht. Auf eine Stimulation mit PGE_2 zeigten 4% der untersuchten Neurone (19/426) einen Anstieg

der intrazellulären Calcium-Konzentration. In dieser Gruppe befanden sich sowohl Nozizeptoren (Capsaicin-responsiv), als auch Kalt-Sensoren (Menthol-responsiv). PGE₂ wird im Rahmen von Entzündungen durch die induzierbaren Enzyme Cyclooxygenase 2 (COX-2) und mikrosomale PGE-Synthase 1 (mPGES-1) vermehrt gebildet und freigesetzt und spielt im Rahmen der Modulierung der Aktivität sensorischer Neurone eine wichtige Rolle (Huang et al. 2006a; Smith et al. 2000; Simm et al. 2016). Zudem trägt die Aktivierung peripherer Neurone, zum Beispiel durch PGE₂, über einen neuronalen Weg, neben der Vermittlung durch pyrogene Substanzen über die Blutbahn, zur Initiation von Fieber bei (Ross et al. 2000; Ott et al. 2015). Auch im Rahmen von neuropathischem Schmerz wird eine Beteiligung von PGE₂ an der Entwicklung von Hyperalgesie und Allodynie diskutiert (Ma et al. 2012). Das Experimentalmodell einer Primärzellkultur von Spinalganglien lässt sich somit hervorragend zur Charakterisierung der Responsivität und Modulierbarkeit sensorischer Neurone auf somatosensorische und neurochemische Stimuli einsetzen.

2. Einfluss inflammatorischer Stimulation der DRG Zellkultur auf die Sensibilisierung von Neuronen und Produktion inflammatorischer Mediatoren

Im Rahmen von Entzündungen kommt es zur Freisetzung zahlreicher inflammatorischer Mediatoren, wie Zytokinen, Chemokinen, Prostaglandinen und weiteren Substanzen. Einige davon sind in der Lage, primäre afferente Neurone, wie Thermo-Rezeptoren und Nozizeptoren zu modulieren und so die Empfindung thermischer und noxischer Stimuli zu beeinflussen (siehe Abschnitt B 2). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie eine simulierte Entzündung die verschiedenen Zelltypen der neuroglialen Primärzellkultur von Spinalganglien beeinflusst (Neurone, Satellitenglia-Zellen, Makrophagen). Mittels Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) in verschiedenen Konzentrationen wurde der Effekt einer Entzündung auf diese Zelltypen und deren Responsivität auf die in Abschnitt 1 genannten thermischen und chemischen Stimuli untersucht. Mit Hilfe des Ca⁺⁺-Imagings konnte gezeigt werden, dass eine LPS-Stimulation zu einer signifikant gesteigerten Capsaicin-Responsivität führt. Außerdem stieg sowohl die Anzahl der Capsaicin-responsiven (76% vs. 71%), als auch der Wärme-

responsiven Zellen (45% vs. 33%) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für diese Sensibilisierungseffekte auf noxische Stimuli können verschiedene Mechanismen verantwortlich sein. Zum einen ist eine Sensibilisierung der Schmerzneurone durch LPS selbst möglich (Diogenes et al. 2011). Daneben kann eine LPS-Stimulation zur Produktion pronozizeptiver Mediatoren führen, die sowohl in der Lage sind, den verantwortlichen Kanal, TRPV1, mittels Phosphorylierung direkt zu modulieren, als auch die Anzahl Capsaicin-responsiver Neurone zu erhöhen (siehe Abschnitt B 2; Huang et al. 2006a; Bhawe und Gereau 2004). In diesem Zusammenhang spielen vor allem die Zytokine TNF α und IL-6 eine wichtige Rolle (Fang et al. 2015; Henssleke et al. 2007; Andrantsch et al. 2009).

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation der Primärzellkultur mit LPS zu einer signifikant gesteigerten Freisetzung sowohl von TNF α , als auch von IL-6 in deren Überstände führt. Auch auf mRNA-Ebene konnte mittels RT-PCR eine erhöhte Genexpression beider Zytokine nachgewiesen werden. Daneben führte die LPS-Stimulation zu einer gesteigerten Expression der COX-2, einem Enzym, dass für die vermehrte Bildung von PGE₂ verantwortlich ist. Immunzytochemisch war TNF α vor allem in einer zellkernnahen Region von Makrophagen detektierbar. Dabei handelt es sich um das *trans*-Golgi-Netzwerk (Wuchert et al. 2008; Manderson et al. 2007; Lieu et al. 2008). Hier werden gebildete Proteine aus dem endoplasmatischen Retikulum gelagert, in ihre aktive Form überführt und auf verschiedene Transportvesikel verteilt um schließlich von der Zelle sezerniert zu werden (Alberts et al. 2017). IL-6 konnte immunzytochemisch nicht eindeutig einem Zelltyp zugeordnet werden. Neben den Makrophagen ist auch eine Beteiligung der Satellitenglia-Zellen und Neurone an der Zytokin-Bildung wahrscheinlich, auch wenn nur ein geringes Signal immunzytochemisch detektierbar war (Blum et al. 2014; Mitterreiter et al. 2017; Hanani 2005; Murphy et al. 1995, eigene Beobachtungen). Für beide Zytokine wird eine wichtige Bedeutung, insbesondere im Zusammenhang mit der Sensibilisierung nozizeptiver Neurone bei neuropathischem Schmerz diskutiert.

TNF α agiert an den Rezeptoren TNFR1 und 2 und ist in der Lage, unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden einzuleiten, die zu einer veränderten Genexpression führen (Miller et al. 2009). Dabei spielt vor allem der Signalweg über NF κ B, aber auch der über MAP Kinasen (p38 MAPK, ERK) eine Rolle (Zelenka et al. 2005; Takahashi et al. 2006). IL-6 bindet an die gp130 Untereinheit und ist in der Lage, sowohl über den NF κ B-, als auch über den MAPK- und den JAK/STAT Signalweg die Genexpression zu modulieren

(Andratsch et al. 2009; Zhou et al. 2016; Fang et al. 2015). Eine Aktivierung der genannten Signalwege lässt sich immunzytochemisch durch ein verstärktes Signal bestimmter Transkriptionsfaktoren im Zellkern nachweisen (Rummel 2016; Schneiders et al. 2015; Damm et al. 2013).

In der vorliegenden Studie wurden die Transkriptionsfaktoren NF κ B, STAT3 und NF-IL6 untersucht. Für NF κ B zeigte sich insgesamt nur ein geringes nukleäres Signal in den Zellen der Primärzellkultur und ein Unterschied zwischen der mit LPS behandelten und der Kontrollgruppe war kaum detektierbar. Für STAT3 ließ sich ein deutlicher Effekt der LPS-Stimulation erkennen. So zeigten vor allem Neurone ein signifikant verstärktes nukleäres STAT3-Signal. Diese gesteigerte Translokation von STAT3 in den Zellkern kann durch das vermehrt gebildete IL-6 und dessen Bindung an die gp130 Untereinheit an Neuronen erklärt werden (Heinrich et al. 1998; Harré et al. 2002; Akira 1997). Dies könnte unter anderem zur Sensibilisierung von Nozizeptoren beitragen (Zhou et al. 2016). Auch eine verstärkte Translokation des Transkriptionsfaktors NF-IL6 konnte sowohl in Neuronen, als auch in Makrophagen der Zellkultur nachgewiesen werden. NF-IL6 ist an der Bildung der Zytokine TNF α und IL-6 beteiligt (Akira et al. 1990; Pope et al. 1994; Matsusaka et al. 1993). Zur Aktivierung von NF-IL6 kommt es unter anderem über den p38 MAPK Signalweg (Horie et al. 2007). Dieser spielt sowohl im Zuge der Bindung von LPS an den TLR-4 Rezeptor, als auch nach Aktivierung des TNFR1 durch TNF α eine entscheidende Rolle. So wird über diesen zum einen die vermehrte Produktion von Zytokinen, aber auch die vermehrte Expression des TRPV1 reguliert (Miller et al. 2009). Eine vermehrte nukleäre Translokation von NF-IL6 in Makrophagen könnte also für die gesteigerte Zytokinbildung im Zuge einer Aktivierung durch LPS oder TNF α mitverantwortlich sein (Pope et al. 1994; Akira et al. 1990). In den Neuronen könnte sie daneben entscheidend zur Sensibilisierung der Nozizeptoren beitragen (Schäfers et al. 2003; Khan et al. 2008).

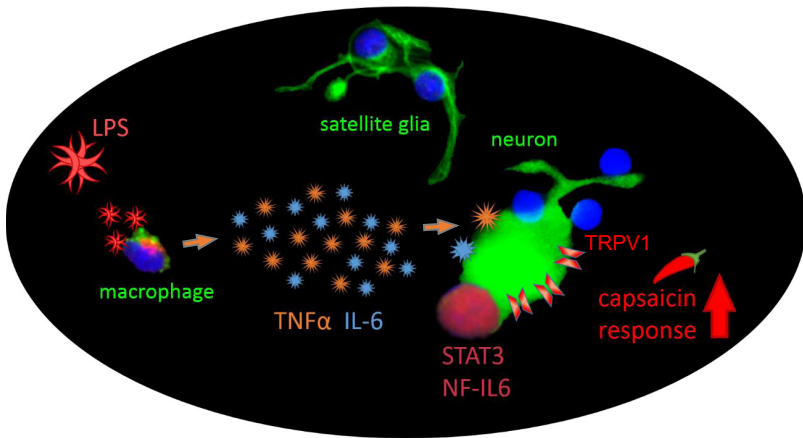





Abbildung 13:

Schematische Darstellung der in Abschnitt 2 diskutierten Ergebnisse
(eigene Abbildung)

Die Abbildung zeigt die in der Primärzellkultur von Spinalganglien vorhandenen Zelltypen (Neurone, Satellitenglia-Zellen und Makrophagen, **grün**). Eine Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) führt besonders in Makrophagen zu einer nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors NF-IL6 (nicht gezeigt) und zu einer vermehrten Bildung von TNFα, die sich immunzytochemisch als verstärktes Signal nahe des Zellkerns zeigt (in der Abb.: **rot**). TNFα und auch IL-6 werden freigesetzt und lassen sich nach LPS-Stimulation vermehrt in den Überständen von Zellkulturen nachweisen (TNFα: , IL-6: ). Beide Zytokine agieren an ihrem jeweiligen Rezeptor an Neuronen (TNFR1 bzw. gp130 Untereinheit), was zu einer vermehrten nukleären Translokation der Transkriptionsfaktoren STAT3 und NF-IL6 in Neuronen führt (nukleäres STAT3 Signal im Neuron: **rot**). Dies könnte zu einer Sensibilisierung von Nozizeptoren durch vermehrten Einbau von TRPV1-Kanälen () und einer verstärkten Zellantwort auf noxische Reize, wie Capsaicin oder Hitze beitragen.

3. Besondere Rolle der peripheren Gliazellen und Makrophagen für die inflammatorische Antwort

Um die besondere Rolle von Makrophagen und Satellitenglia-Zellen im Zusammenhang mit der inflammatorischen Antwort von Spinalganglien weiter zu untersuchen, wurden diese in einem Folgeversuch durch Cisplatin in ihrem Wachstum gehemmt. Cisplatin ist ein Zytostatikum und wird als Medikament in der Krebstherapie eingesetzt (Dasari und Tchounwou 2014). Im Zuge der Therapie mit Cisplatin treten häufig neurotoxische sowie periphere neuropathische Nebenwirkungen auf (Gregg et al. 1992; Podratz et al. 2011; Boyette-Davis et al. 2015). In der vorliegenden Studie wurde Cisplatin mit dem Ziel eingesetzt, das Wachstum von Gliazellen zu hemmen, ohne dabei die Vitalität der Neurone zu beeinflussen (Sugimoto et al. 2000). Die Dosierungen wurden dementsprechend, wie bereits von anderen Autoren beschrieben, gewählt (Jiang et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cisplatin sowohl Satellitenglia-Zellen stark in ihrem Wachstum hemmt, als auch die Anzahl der Makrophagen in der Primärzellkultur drastisch reduziert. Die Vitalität der Neurone sowie deren Responsivität auf verschiedene Stimuli in Ca^{++} -Imaging Versuchen waren davon nicht bzw. nur gering beeinflusst. So zeigten Neurone nach einer Inkubation mit Cisplatin einen stärkeren Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration auf eine Stimulation mit KCl. Dies kann sich dadurch erklären lassen, dass Neurone in einer mit Cisplatin behandelten Kultur weniger von Satellitenglia-Zellen umgeben sind und somit eine bessere Erreichbarkeit der Neuronenoberfläche für stimulierende Substanzen gewährleistet ist.

Daneben konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit Cisplatin deutliche Effekte auf die inflammatorische Antwort nach einer LPS-Stimulation hat. So sank die Menge an produziertem $\text{TNF}\alpha$ und IL-6 nach Cisplatin-Behandlung und anschließender LPS-Stimulation auf einen Bruchteil der Konzentration in der Kontrollgruppe (17 bzw. 7,5% für $\text{TNF}\alpha$, 43 bzw. 36% für IL-6 je nach Cisplatin-Dosis). Eine ähnlich starke Reduktion der Zytokin-Expression konnte auch auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR gezeigt werden. Neurone, die einer Behandlung mit Cisplatin und LPS ausgesetzt waren, zeigten in Ca^{++} -Imaging Versuchen keine signifikant gesteigerte Capsaicin-Antwort, anders als es Neurone nach einer Stimulation mit LPS allein taten. Die Ausschaltung der peripheren Gliazellen und Makrophagen in den Spinalganglien führt folglich zu einer Reduktion der

Zytokin-Bildung und es hemmt die LPS-induzierte Steigerung der Ca^{++} -Signale auf einen noxischen Stimulus (Capsaicin). Daraus lässt sich schließen, dass sowohl die Satellitenglia-Zellen, als auch die Makrophagen einen erheblichen Anteil an der Immunantwort nach LPS-Stimulation haben und durch die Bildung der Zytokine zur Sensibilisierung der nozizeptiven Neurone beitragen.

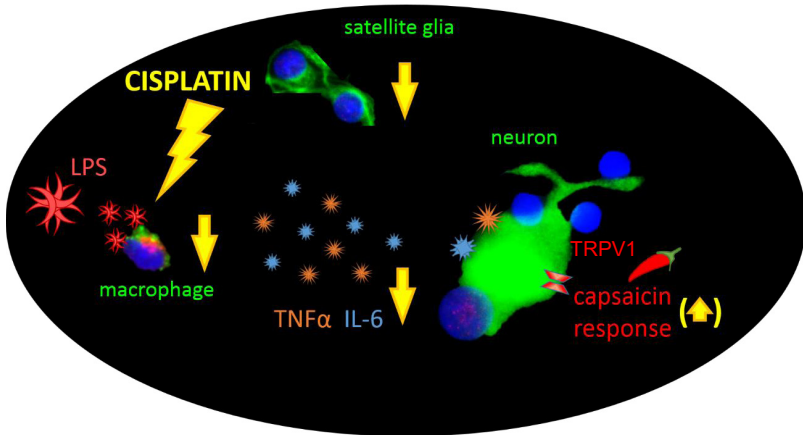


Abbildung 14:

Schematische Darstellung der in Abschnitt 3 diskutierten Ergebnisse
(eigene Abbildung)

Die Abbildung zeigt beispielhaft die Zelltypen einer Primärzellkultur von Spinalganglien (grün). Der Einfluss von Cisplatin ist in gelber Farbe dargestellt. Der Einsatz von Cisplatin führt zu einer signifikant reduzierten Anzahl an Makrophagen in Primärzellkulturen von Spinalganglien. Daneben kommt zu einer deutlichen Hemmung des Wachstums von Satellitenglia-Zellen, welche nicht mehr die typischen Fortsätze ausbilden. Werden diese mit Cisplatin vorbehandelten Zellen einer LPS-Stimulation ausgesetzt, kommt es zu einer reduzierten Expression und Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ und IL-6. In Folge der verringerten Zytokinmenge in der Umgebung der Neurone, kommt es auch zu einem geringeren (nicht mehr signifikanten) Anstieg der Capsaicin-Antwort. Periphere Gliazellen tragen folglich durch Produktion und Freisetzung von Zytokinen entscheidend zur Sensibilisierung von Nozizeptoren bei.

4. Effekte von Gabapentinoiden auf die somatosensorische und inflammatorische Stimulation von Primärzellkulturen der Spinalganglien

Gabapentinoide, wie Gabapentin und Pregabalin, wurden ursprünglich als GABA-Analoga mit der Vermutung einer inhibitorischen, GABAergen Wirkung synthetisiert. Sie sind in der Lage, sowohl bei neuropathischem als auch bei inflammatorischem Schmerz für eine Schmerzlinderung zu sorgen, agieren allerdings nicht am GABA Rezeptor (Lanneau et al. 2001). Die für den Schmerz-reduzierenden Effekt verantwortlichen Mechanismen sind komplex und nach wie vor nicht vollständig geklärt. Ein Ziel der vorliegenden Studie war es, den Effekt von Gabapentinoiden auf Primärzellkulturen von Spinalganglien im Rahmen von noxischen und inflammatorischen Stimuli zu untersuchen.

In einer ersten Versuchsreihe wurde der Einfluss einer Inkubation mit Gabapentin bzw. Pregabalin auf die inflammatorische Antwort der Primärzellkultur nach LPS-Stimulation untersucht. Mittels RT-PCR konnte hierbei festgestellt werden, dass eine Tendenz für eine reduzierte Genexpression der mPGES-1 vorlag. Die Expression von IL-6 war signifikant reduziert. Dies ist vor allem im Zusammenhang mit den sensibilisierenden Effekten von IL-6 auf nozizeptive Neurone von Bedeutung (siehe Abschnitt 2; Andratsch et al. 2009; Fang et al. 2015). Ähnliche antiinflammatorische Effekte von Gabapentinoiden konnten auch in anderen Zusammenhängen nachgewiesen werden. So zeigten Anfuso et al. in einem Modell okulärer Entzündungen, dass sowohl die Zytokinproduktion, als auch die Bildung von COX-2 und PGE₂ nach Gabapentin-Behandlung reduziert ist (Anfuso et al. 2017). In einer weiteren Studie wurden die antiinflammatorischen Eigenschaften von Gabapentinoiden in Carrageenan-induzierten Pfoten-Ödemen nachgewiesen. Auch hier zeigte sich eine signifikant reduzierte Zytokinbildung bei Mäusen, welche mit Gabapentinoiden vorbehandelt waren (Dias et al. 2014). Auch in Tiermodellen von neuropathischem Schmerz konnte ein antiinflammatorischer Effekt nachgewiesen werden. In einer Studie konnte die durch Morphine gesteigerte Zytokinproduktion im Rückenmark durch den Einsatz von Gabapentinoiden reduziert werden (Bao et al. 2014). In einer weiteren Studie wurde herausgefunden, dass in einem Modell von neuropathischem Schmerz durch intrathekale

Injektion von Gabapentin die Expression proinflammatorischer Zytokine im Rückenmark reduziert ist, während die von IL-10, einem antiinflammatorischem Zytokin, gesteigert ist (Lee et al. 2013). Kürzlich wurde zudem in einer Studie von Yamaguchi et al. in einer U373 MG Zelllinie gezeigt, dass sowohl Gabapentin, als auch Pregabalin dazu in der Lage sind, die Produktion von IL-6 zu reduzieren und außerdem intrazelluläre Signalwege, wie den p38 MAPK- und NF κ B-Signalweg, zu hemmen (Yamaguchi et al. 2017). Beide Signalwege sind für die Bildung von Zytokinen, wie auch für die Sensibilisierung von Nozizeptoren von Bedeutung (siehe Abschnitt 2; Miller et al. 2009; Zelenka et al. 2005; Takahashi et al. 2006; Andratsch et al. 2009). Dass in der vorliegenden Studie kein signifikanter Unterschied der Zytokin-Konzentrationen in den Überständen feststellbar war, kann dem zeitlichen Versatz von Genexpression und Freisetzung von Zytokinen geschuldet sein. Bezüglich der reduzierten Expression der mPGES-1 wäre in künftigen Studien zu überprüfen, ob und wie stark sich dieser Effekt tatsächlich auf die Bildung von PGE₂ auswirkt, dessen Bedeutung für die Sensibilisierung peripherer Nozizeptoren gut dokumentiert ist. Neben der Untersuchung inflammatorischer Mediatoren mittels RT-PCR wurde auch die Genexpression des TRPV1 sowie der $\alpha_2\delta$ -1 Untereinheit von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen untersucht. Dabei zeigte sich die Tendenz einer durch LPS gesteigerten Expression des TRPV1. Diese LPS-induzierte Steigerung war weder nach Inkubation mit Gabapentin noch mit Pregabalin zu erkennen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte der von Yamaguchi et al. beschriebene Einfluss auf intrazelluläre Signalwege über p38 MAPK oder NF κ B zur Steigerung der Expression bestimmter Zielgene hinweisen (Yamaguchi et al. 2017).

In einer weiteren Versuchsreihe der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer Inkubation mit Gabapentin und Pregabalin auf Zellantworten einzelner Neurone auf Stimulation mit Menthol und Capsaicin untersucht. Beide Gabapentinoide hatten keinen Einfluss auf die Menthol-Responsivität der Neurone. Für die Capsaicin-Responsivität konnte gezeigt werden, dass Gabapentinoide zu keinem signifikanten Unterschied bei Zellantworten auf die Gesamtpopulation der Neurone bezogen führen. Bei genauerer Betrachtung ist jedoch zu erkennen, dass einzelne Neurone mit teils deutlich reduzierten Ca⁺⁺-Signalen auf einen Capsaicin-Stimulus reagieren. Außerdem ist die Zahl Capsaicin-responsiver Neurone in Gabapentin- (76%) und Pregabalin-behandelten (69%) Primärzellkulturen geringer als in der Kontrollgruppe (81%). Diese Ergebnisse weisen auf eine antinozizeptive Komponente der Gabapentinoid-Wirkung neben dem oben

beschriebenen antiinflammatorischen Effekt hin. Eine direkte Beeinflussung des TRPV1 durch die Gabapentinoide ist jedoch unwahrscheinlich. Hingegen ist die Wirkung dieser an spannungsabhängigen Calcium-Kanälen (Ca_v) schon sehr detailliert untersucht. In mehreren Studien konnte ein direkter inhibierender Effekt von Gabapentin und Pregabalin auf den Calcium-Einstrom durch Ca_v 's nachgewiesen werden (Alden und Garcia 2001; Martin et al. 2002; Sarantopoulos et al. 2002; Sutton et al. 2002; McClelland et al. 2004). Kommt es in Calcium-Imaging Versuchen im Zuge der Aktivierung spezifischer Kanäle (z.B. TRPV1 durch Capsaicin) zu einem Calcium-Einstrom, kann dies aufgrund der Spannungsänderung auch zu einer Aktivierung der Ca_v 's führen, welche dann zu dem gemessenen Unterschied der intrazellulären Calcium-Konzentration ($\Delta\text{ratio}[340/380\text{nm}]$) beitragen. Werden die Ca_v 's durch Gabapentinoide in ihrer Funktion gehemmt, kann es zu einer Reduktion des Ca^{++} -Signales kommen, welches nicht auf einem direkten Effekt an dem ursprünglich aktivierten Kanal (z.B. TRPV1) beruht. Insgesamt waren die durch Gabapentinoide erzielten Effekte auf die Primärzellkultur von Spinalganglien als eher moderat einzustufen. In weiterführenden Untersuchungen wäre zu ermitteln, ob eine längerfristige Inkubation der Kulturen mit Gabapentin oder Pregabalin zu stärkeren antiinflammatorischen bzw. antinozizeptiven Effekten führt.

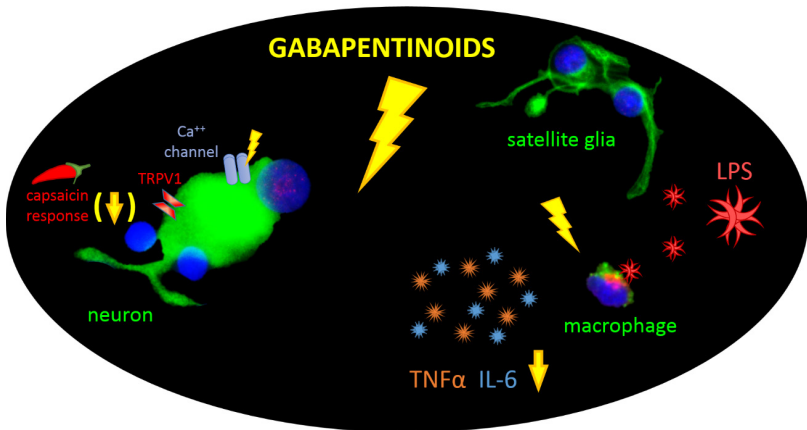


Abbildung 15:

Schematische Darstellung der in Abschnitt 4 diskutierten Ergebnisse
(eigene Abbildung)

Die Abbildung zeigt beispielhaft die Zelltypen einer Primärzellkultur von Spinalganglien (**grün**). Mögliche Einflüsse von Gabapentinoiden (Gabapentin bzw. Pregabalin) sind in **gelber** Farbe dargestellt. Untersucht wurden die Einflüsse von Gabapentinoiden auf somatosensorische (linke Seite) sowie inflammatorische Stimulation (rechte Seite).

Es konnte gezeigt werden, dass es bei einzelnen Neuronen nach Inkubation mit Gabapentinoiden zu reduzierten Ca⁺⁺-Signalen auf einen Capsaicin-Stimulus kommt. Ein Effekt direkt am TRPV1 ist jedoch unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher ist, dass es durch Inhibition spannungsabhängiger Calcium-Kanäle zu veränderten Ca⁺⁺-Signalen der Neurone kommt. In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Effekte von Gabapentinoiden auf die inflammatorische Antwort nach LPS-Stimulation untersucht. Dabei konnte mittels RT-PCR gezeigt werden, dass die Genexpression von IL-6 durch Gabapentinoide signifikant reduziert ist. Dieser antiinflammatorische Effekt der Gabapentinoide könnte insbesondere bei der Therapie von neuropathischem Schmerz von Bedeutung sein.

5. Einfluss thermischer Stimulation auf Zellen von Primärzellkulturen des *Nucleus preopticus medianus* (MnPO)

Der *Nucleus preopticus medianus* (MnPO) gilt als wichtigste zentralnervöse Struktur zur Regulation der Körpertemperatur (McKinley et al. 2015; Morrison und Nakamura 2018). Hier werden eingehende thermische Informationen auf efferente Neurone verschaltet, die bestimmte thermoregulatorische Mechanismen in Gang setzen (Morrison et al. 2008). Diese Informationen kommen zum Teil von sensorischen Neuronen aus der Peripherie, die in der Lage sind, die Umgebungstemperatur durch spezifische Kanäle aus der TRP-Familie, wie dem TRPM8 für Kälte ($<25\text{ }^{\circ}\text{C}$), dem TRPM2 für Wärme ($>38\text{ }^{\circ}\text{C}$) oder dem TRPV1 für starke Hitze ($>45\text{ }^{\circ}\text{C}$), zu detektieren (Bautista et al. 2007; Caterina et al. 1997; Tominaga et al. 1998; Tan und McNaughton 2016). Nach einer synaptischen Übertragung im Dorsalhorn des Rückenmarks (Laminae I & II, *Substantia gelatinosa*) wird der Reiz über den *spinoparabrachialen Signalweg* zunächst in den *lateralen parabrachialen Nucleus* (LPB) und von dort in den MnPO geleitet (Morrison und Nakamura 2011). Neben dieser peripheren Temperaturwahrnehmung, spielt auch die Detektion der Temperatur in zentralnervösen Strukturen eine wichtige Rolle für die Thermoregulation. So konnten Kälte- & Wärme-sensitive Neurone sowohl im Dorsalhorn des Rückenmarks (Andrew und Craig 2001; Craig et al. 2001; Bester et al. 2000; Brock und McAllen 2016), als auch im LPB (Xue et al. 2016) und in verschiedenen Regionen des Hypothalamus (Abe et al. 2003; Hori und Shinohara 1979; Kobayashi 1986) nachgewiesen werden. Eine thermische Stimulation im Bereich des Hypothalamus *in vivo* führt bei Säugern zur Aktivierung entsprechender thermoregulatorischer Mechanismen (Baldwin und Ingram 1976; Carlisle und Ingram 1973; Chai und Lin 1972; Mazher et al. 2018). Auch im Zusammenhang mit der Pathophysiologie des Fiebers spielt der MnPO eine bedeutende Rolle (Roth und Blatteis 2014; Damm et al. 2012; Roth et al. 2009). Die physiologische Funktion und die Arbeitsweise der zentralen Thermosensoren und deren Einfluss auf die Thermoregulation sind bislang zwar intensiv, vor allem mittels elektrophysiologischer Methoden erforscht worden (Boulant 2000; Kelso et al. 1982; Hori und Shinohara 1979; Hori et al. 1982). Sie sind allerdings nach wie vor nur unvollständig verstanden. Durch die Entdeckung der TRP-Kanäle eröffnete sich ein neuer experimenteller Ansatz, um auch die zentralen Thermosensoren experimentell zu untersuchen.

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Responsivität von Zellen aus neuroglialen Primärzellkulturen des MnPO auf thermische Reize und neurochemische Stimuli zu untersuchen. Dabei wurde neben einem Kälte- und Wärme-Stimulus der im MnPO bedeutende Transmitter Glutamat, sowie die Agonisten der Kanäle TRPM8 (Menthol) und TRPV1 (Capsaicin) getestet. Auf ein Abkühlen auf 25 °C zeigten 4 von 212 untersuchten Neuronen (ca. 2%) einen Anstieg der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration. Nur ein Neuron von 212 reagierte auf einen Menthol-Stimulus. In der Literatur finden sich nur wenige Untersuchungen zu Kälte-responsiven Neuronen im Bereich des MnPO. Hori et al. untersuchten die Thermo-Responsivität von hypothalamischen Neuronen und entdeckten in 640 untersuchten Neuronen vierzehn Kälte-responsive, was ebenfalls ca. 2% entspricht (Hori und Shinohara 1979). Abe et al. zeigten in akut dissoziierten Zellen des präoptischen und anterioren Hypothalamus von Ratten, dass 9% der untersuchten Neurone (24/267) in Ca^{++} -Imaging Versuchen auf einen Kälte-Stimulus reagieren (Abe et al. 2003). Auf Menthol zeigte in diesen Versuchen kein Neuron einen Anstieg der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration. Travis et al. untersuchten die Kälte-Responsivität von Neuronen des MnPO in frisch präparierten Schnitten des Gehirns. Dabei zeigten 5 von 208 untersuchten Neuronen eine Zellantwort (ca. 2%). Es gibt also eine geringe Anzahl Kälte-responsiver Neurone im zentralen Nervensystem, wobei der in der Peripherie für das Kälteempfinden bedeutende TRPM8, hier eher unbedeutend zu sein scheint. Die Rolle dieser zentralen Kälte-Sensoren für die Thermoregulation ist jedoch kritisch zu hinterfragen, da man schon bei einer Körperkerntemperatur von unter 28 °C von einer hochgradigen Hypothermie ausgehen muss, bei der ein Patient bereits im Koma liegt, ein Enzephalogramm keinerlei Aktivität mehr zeigt und auch eine Pupillenreaktion nicht mehr vorhanden ist (McCullough und Arora 2004). Eine physiologische Funktion dieser Kälte-Sensoren konnte bislang nicht gezeigt werden.

Neben der Responsivität auf Kälte wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch jene auf einen Wärme-Stimulus untersucht. Dabei zeigten 24 von 327 untersuchten Neuronen (7,5%) sowie 23 von 241 untersuchten Astrozyten (9,5%) einen schnellen Anstieg der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration in Form eines Peaks als Antwort auf das Erwärmen auf 45 °C. Darüber hinaus reagierten weitere 33 Neurone (10%) sowie 107 Astrozyten (44%) mit einem langsamen Anstieg des intrazellulären Ca^{++} -Levels, parallel zur Temperatursteigerung. Die Wärme-Responsivität hypothalamischer Neurone wurde auch von anderen Arbeitsgruppen mittels verschiedener Methoden untersucht. Kelso et al. untersuchten in einer Versuchsreihe 139 Neurone, wobei etwa 30% dieser auf einen

Wärme-Stimulus reagierten (Kelso et al. 1982). Auch die Arbeitsgruppe um Hori untersuchte in mehreren Studien die Wärme-Responsivität hypothalamischer Neurone, insbesondere in der präoptischen Region (POA) und dem anterioren Hypothalamus (AH). In einer Studie von 1979 zeigten 118 von 640 untersuchten Neuronen (18,4%) eine gesteigerte Impulsrate nach einem Anstieg der Temperatur und wurden damit als warm-sensitiv klassifiziert (Hori und Shinohara 1979). In einer darauf folgenden Studie wurden die Regionen POA und AH verglichen und es zeigten 33% (25/75) der Neurone aus dem AH, sowie 30% (88/291) der Neurone aus der POA gesteigerte Impulsraten auf Wärme-Stimuli (Hori et al. 1982). Im Bereich des MnPO untersuchten auch Travis et al. die Wärme-Responsivität und wiesen eine solche bei 49 von 208 Neuronen (23,6%) nach. Die Wahrnehmung von gesteigerten Temperaturen im ZNS scheint also von größerer Bedeutung zu sein, da eine deutlich größere Anzahl Wärme-empfindlicher Neurone existiert. Der Rezeptor, der für die Wärmedetektion im Bereich des Hypothalamus verantwortlich ist, wurde erst kürzlich als der TRPM2-Kanal identifiziert (Siemens und Kamm 2018; Song et al. 2016; Tan und McNaughton 2016). Dessen Funktion liegt vor allem darin, einen zu hohen Anstieg der Temperatur im ZNS und damit eine Überhitzung zu verhindern (Song et al. 2016).

In der vorliegenden Studie wurde auch die Responsivität der Zellen von Primärzellkulturen des MnPO auf Capsaicin, einen Agonisten am Hitze-empfindlichen Kanal TRPV1, untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass keine der untersuchten Zellen in der Kultur (Neurone: 0/240, Astrozyten: 0/134) direkt auf einen Capsaicin-Stimulus mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration reagierten. Eine direkte Beteiligung des TRPV1 an der Regulation der Körpertemperatur ist umstritten. Er scheint im zentralen Nervensystem eher eine Funktion als Modulator der synaptischen Plastizität sowie der Wärme-Responsivität von Neuronen, als eine direkte sensorische Funktion für noxische Stimuli, wie in peripheren Neuronen, zu haben (Alter und Gereau 2008; Karlsson et al. 2005; Riera et al. 2014; Sasamura et al. 1998; McGaraughty et al. 2009).

Für die Responsivität der Astrozyten auf einen Wärme-Stimulus gibt es mehrere Erklärungsansätze. Zum einen könnten sie durch die Freisetzung von Transmittern (z.B. Glutamat) aus Neuronen, die durch die Erwärmung aktiviert wurden, sekundär beeinflusst werden. Hierfür spricht, dass alle Astrozyten, die eine Zellantwort auf das Erwärmen zeigten, auch durch Glutamat aktivierbar waren. Zum anderen ist eine primäre Aktivierung durch einen thermischen Reiz möglich. Hierfür kommen verschiedene von

Astrozyten exprimierte Rezeptoren in Betracht. Zum einen konnte gezeigt werden, dass der TRPV1 von Astrozyten im ZNS exprimiert wird (Mannari et al. 2013; Doly et al. 2004). Da jedoch der Einsatz von Capsaicin keinen Effekt auf die Astrozyten hatte, ist dessen Beteiligung unwahrscheinlich. Auch der TRPV2 wird von Astrozyten exprimiert und durch Hitze-Reize angesprochen (Shibasaki et al. 2013). Dessen Aktivierungsschwellenwert liegt jedoch bei einer Temperatur oberhalb von 50 °C, welche in den vorliegenden Versuchen nicht erreicht wurde (max. 45 °C). Wang et al. zeigten, dass der TRPM2, welcher als zentraler Thermosensor in Neuronen gilt, auch von Astrozyten und anderen Gliazellen exprimiert wird. Allerdings verweisen sie eher auf eine modulatorische Funktion des Kanals in der neuronalen Plastizität, als auf eine sensorische Funktion (Wang et al. 2016). Auch der TRPV4 wird häufig als bedeutender Wärmesensor diskutiert, da dessen Aktivierung *in vivo* Wärmeabgabemechanismen fördert und eine intravenöse Antagonisierung des Kanals zu einem Anstieg der Körpertemperatur führt (Vizin et al. 2015). Im Gehirn wird ihm vor allem eine Funktion in der Steigerung der neuronalen Erregbarkeit zugesprochen (Shibasaki 2016). Auch rund 30% der Astrozyten im Gehirn exprimieren den TRPV4 (Shibasaki et al. 2014). Eine direkte sensorische Funktion des Kanals in Astrozyten ist jedoch bislang nicht beschrieben worden. Es kommen also verschiedene Kanäle aus der TRP-Familie, die in Neuronen als Temperaturempfindlich gelten, auch für eine Aktivierung von Astrozyten in Frage. Die Beobachtung möglicher Temperatur-responsiver Astrozyten bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, um tatsächlich eine physiologische Funktion der Kanäle an diesem Zelltyp nachzuweisen.

6. Neurogliale Primärzellkulturen zur Untersuchung der sensorischen Wahrnehmung - Vorteile und Limitationen

In der vorliegenden Studie, wie auch in zahlreichen der zitierten Veröffentlichungen, wurden Primärzellkulturen von verschiedenen neuronalen Strukturen eingesetzt, um die Detektion, Weiterleitung, Übertragung und zentrale Verarbeitung somatosensorischer Stimuli detailliert untersuchen zu können. Insgesamt werden in der biomedizinischen Forschung in fast allen Bereichen Zellkulturen eingesetzt, um molekulare und zelluläre Mechanismen aufzudecken. Sie stellen eine gute Alternative zu *in vivo* Tierversuchsmodellen dar, sind jedoch nicht in der Lage, den komplexen Zusammenhang des Gesamtorganismus zu repräsentieren und können diese somit niemals gänzlich ersetzen. Dadurch ist die Aussagekraft von Ergebnissen aus Versuchen mit Primärzellkulturen immer gewissen Limitationen unterworfen und muss immer im Gesamtzusammenhang mit anderen experimentellen Ansätzen gesehen werden. Der bedeutendste Vorteil der Verwendung von Primärzellkulturen stellt die Reduktion der Anzahl an Versuchstieren dar. Diese ist insbesondere durch die Etablierung des 3R-Prinzips (**R**eplacement, **R**educement, **R**efinement) in der Forschung in den Vordergrund gerückt (Liebsch et al. 2011). Zum Beispiel wurden für das Anlegen einer Primärzellkultur von Spinalganglien zwei Ratten verwendet. Diesen konnten jeweils ca. 20 Spinalganglien entnommen werden, um insgesamt etwa 50 einzelne Kulturen herzustellen. In diesen lassen sich anschließend vielfältige Substanzen (LPS, Cisplatin, Gabapentinoide) in verschiedenen Konzentrationen sowie auch unterschiedliche methodische Ansätze (RT-PCR, Immunzytochemie, Ca^{++} -Imaging, Bio-Assays, usw.) anwenden, um Effekte auf zellulärer und molekularer Ebene zu erforschen. Aus wenigen Tieren lassen sich somit mehr Versuchsgruppen bilden, als es in *in vivo* Experimenten möglich wäre.

Ein weiterer Vorteil von Primärzellkulturen besteht darin, dass sich einzelne Zellen eines Gewebes ohne die vielen Einflüsse im komplexen Zusammenspiel des Gesamtorganismus untersuchen lassen. Möchte man spezifische Funktionen von Zellen und deren Beteiligung am Geschehen detailliert untersuchen, müssen bestimmte Faktoren, die ebenfalls einen Einfluss haben können, ausgeschaltet werden. Im Beispiel der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Spinalganglien-Primärzellkulturen wurde durch den Einsatz von LPS eine Entzündung simuliert. Im intakten Organismus würde

eine Entzündung im Bereich der Spinalganglien zu einer massiven Infiltration von Immunzellen aus der Blutbahn führen, welche ebenfalls Effekte auf die ortsständigen Zellen haben. Im Rahmen dieser Studie ging es aber insbesondere um die Beteiligung lokaler Makrophagen und Satellitenglia-Zellen am Entzündungsgeschehen. Um genau dieses untersuchen zu können, muss eine Einbindung anderer Zellen verhindert werden. Aufbauend auf Studien mit Primärzellkulturen muss dann wiederum untersucht werden, welche Rolle die nachgewiesenen Funktionen einzelner Zelltypen im Gesamtorganismus spielen.

Zusätzlich lässt sich in neuroglialen Primärzellkulturen die Responsivität einzelner Neurone auf bestimmte neurochemische und somatosensorische Stimuli sehr viel genauer untersuchen. Zum Beispiel wurde in *in vivo* Versuchen die Beteiligung zentralnervöser Thermosensoren an der Thermoregulation untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass ein Erwärmen bzw. Abkühlen des Hypothalamus zur Aktivierung entsprechender Wärmeabgabe- bzw. -bildungsmechanismen führt (Baldwin und Ingram 1976; Carlisle und Ingram 1973). Erst später wurde der MnPO als zentrale Schaltstelle der Thermoregulation entdeckt (Nakamura und Morrison 2008b, 2010). Doch ob ein thermischer Stimulus zu einer direkten Aktivierung von MnPO-Neuronen und den damit einhergehenden Effekten auf die Thermoregulation führt oder ob diese sekundär durch ausgeschüttete Neurotransmitter von anderen Zellen aktiviert werden, lässt sich durch *in vivo* Studien nur schwer beurteilen. Durch die Untersuchung einzelner dissoziierter Neurone aus einer spezifischen Region, wie dem MnPO, lässt sich der Einfluss anderer Zellen minimieren. Damit kann der Fokus genau auf die gewünschte Zellpopulation gelegt werden.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass Primärzellkulturen sowohl in der Grundlagenforschung, wie auch in der pharmakologischen Forschung durchaus ihre Berechtigung haben, da hier Effekte auf einzelne Zellen und deren Beteiligung am komplexen Geschehen detailliert untersucht werden können. Außerdem kann durch sie die Anzahl eingesetzter Versuchstiere reduziert werden. Dennoch können sie Tierversuche nie gänzlich ersetzen. Vielmehr müssen *in vivo* und *in vitro* Versuche als unterschiedliche, sich ergänzende Steine eines Mosaiks angesehen werden, die erst im Gesamtzusammenhang Erklärungsansätze für komplexe Fragestellungen in der Grundlagenforschung bieten können.

7. Perspektiven für weiterführende Untersuchungen

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse bieten bereits viele interessante Einblicke in das komplexe Zusammenspiel von Immun- und Nervensystem im Zuge peripherer Entzündungen, die in der Lage sind, die Empfindung somatosensorischer Reize zu beeinflussen. Um die beschriebenen Resultate detaillierter zu untersuchen, sind hierauf aufbauende, weiterführende Untersuchungen geplant.

Zum einen können Spinalganglien als organotypische Explants kultiviert werden (Inczyedy-Marcsek et al. 1993; Jeftinija et al. 1992; Li et al. 2013). Dabei wird das entnommene Gewebe nicht enzymatisch verdaut und dissoziiert, sondern als intakte Struktur in Kultur gebracht. Zellverbände behalten dadurch ihre physiologischen Beschaffenheiten und Zusammenhänge. Durch den Einsatz dieses Modells erzielt man Ergebnisse, die näher an den Verhältnissen des intakten Gewebes sind. Die Untersuchung einzelner Zellen stellt jedoch eine größere Herausforderung dar.

Daneben soll auch eine Primärzellkultur des Dorsalhorns des Rückenmarks (Lamina I und II, *Substantia gelatinosa*) etabliert werden. An dieser Stelle findet die synaptische Übertragung von primären afferenten Neuronen auf Projektionsneurone oder Interneurone statt, die die Information an das Gehirn weiterleiten bzw. vor Ort modulieren (Todd 2010). Es ist bekannt, dass es im Rahmen der peripheren Sensibilisierung von Nozizeptoren bei inflammatorischem und auch insbesondere bei neuropathischem Schmerz zur Aktivierung von Glia-Zellen (Astrozyten und Mikroglia) im Dorsalhorn des Rückenmarks kommt (Vega-Avelaira et al. 2013; Svensson et al. 2003; Raghavendra et al. 2003). Deren Beteiligung an neuropathischem Schmerz wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Durch die Etablierung einer Primärzellkultur dieser Struktur ließen sich die Einflüsse einer simulierten Entzündung (LPS-Stimulation) auf die Zellen dieser Region detaillierter untersuchen. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit durch organotypische Explants des Dorsalhorns zusammen mit den Spinalganglien das komplexe Zusammenspiel zwischen primären sensorischen Neuronen und den Zellen des Dorsalhorns zu erforschen (Peterson und Crain 1982; Pasterkamp et al. 2000).

Zur Untersuchung der Effekte von inflammatorischem und neuropathischem Schmerz wurden auch verschiedene *in vivo* Tiermodelle etabliert. Hierzu zählen für den inflammatorischen Schmerz unter anderem die Injektion von Complete Freund's

Adjuvant (CFA) oder Carrageenan (Zhao et al. 2015; Tamaddonfard et al. 2013; Dias et al. 2014). Der Einsatz beider Substanzen führt zu typischen Symptomen mit einer gesteigerten Sensibilität auf thermische und noxische Reize. Daher lassen sich mit diesen Modellen sowohl pathophysiologische Aspekte, als auch pharmakologisch interessante Ansatzpunkte im Tiermodell untersuchen. Die Induktion von neuropathischem Schmerz ist komplizierter und kann in periphere und zentrale Schmerzmodelle unterteilt werden (für einen Überblick siehe: Jaggi et al. 2011). Dabei werden durch eine Verletzung des Nerven (Axotomie, Ligierung, Einfrieren) Symptome von neuropathischem Schmerz hervorgerufen. Nach dem Schmerz-induzierenden Stimulus lassen sich die hierfür interessanten Gewebe, wie Spinalganglien, Dorsalhorn des Rückenmarks oder das Gehirn, durch vielfältige Labormethoden detailliert untersuchen. Dadurch lassen sich pathophysiologische Mechanismen besser verstehen und mögliche Therapieansätze entwickeln.

Auch die Untersuchung aktueller Therapieansätze lässt sich im Zellkulturmodell weiter fortführen. Neuere Studien zeigen, dass durch Einsatz von Stammzellen die Symptomatik von neuropathischem Schmerz verringert und die Regeneration von Nerven gefördert werden kann (Gama et al. 2018; Ladak et al. 2011; Lin et al. 2017; Liu et al. 2017; Luca et al. 2015; Sarmiento et al. 2014; Watanabe et al. 2015). Zur näheren Untersuchung möglicher protektiver und neuroregenerativer Effekte von Stammzellen ist geplant, die etablierte Primärzellkultur von Spinalganglien, wie auch die zu etablierende Kultur des Dorsalhorns des Rückenmarks mit Fettgewebs-Stammzellen in Co-Kultur zu bringen. Anschließend lassen sich zum einen Effekte der Stammzellen auf die neuroglialen Primärzellkulturen untersuchen, zum anderen aber auch Effekte der Primärzellkultur auf die Differenzierung der Stammzellen. Dadurch können neue Erkenntnisse bezüglich des therapeutischen Einsatzes von Stammzellen zur Behandlung von neuropathischem Schmerz gewonnen werden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die Detektion thermischer und noxischer Reize aus der Umwelt dient einerseits der Aufrechterhaltung der körpereigenen Homöostase und andererseits dem Schutz des Organismus vor schädlichen Einflüssen. Hierfür verantwortlich sind hauptsächlich Rezeptoren der *transient receptor potential* (TRP) -Familie in freien Nervenendigungen, deren Zellkörper in den Spinalganglien (DRG) liegen. Primärzellkulturen von Spinalganglien bestehen aus Neuronen (ca. 10%), Satellitenglia-Zellen (ca. 80%) und einer geringen Anzahl an Makrophagen (ca. 1%). Mit Hilfe dieses Zellkultur-Modells lassen sich Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene detailliert untersuchen.

In einer ersten Studie ging es um den Einfluss spezifischer Stimuli, wie Temperaturveränderungen, Capsaicin, Menthol und PGE₂ auf einzelne Zellen in Ca⁺⁺-Imaging-Versuchen. Zum anderen wurde die inflammatorische Antwort der Primärzellkulturen auf eine Lipopolysaccharid (LPS) -Stimulation und die Beteiligung der verschiedenen Zelltypen hieran untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass 75% der Neurone auf einen Capsaicin-Stimulus einen Anstieg der intrazellulären Ca⁺⁺-Konzentration zeigen und damit als Nozizeptoren einzuordnen sind, während 10% auf Menthol reagieren und sich somit als Kalt-Sensoren charakterisieren lassen. Durch eine Stimulation mit LPS stieg die Responsivität auf noxische Stimuli (Capsaicin) sowie die Anzahl Hitze-responsiver Neurone signifikant an. Zu einer solchen Sensibilisierung von Nozizeptoren kommt es häufig im Rahmen von Entzündungen und Verletzungen im Bereich peripherer Nerven. Maßgeblich beteiligt an diesem Prozess sind die Zytokine Tumornekrosefaktor alpha (TNFα) und Interleukin 6 (IL-6). Für beide konnte eine signifikant gesteigerte Genexpression und Freisetzung in die Überstände der Kulturen nach LPS-Stimulation nachgewiesen werden. Immunzytochemisch war ein Signal für TNFα vor allem in Makrophagen der Kultur detektierbar. Daneben konnte mittels Immunzytochemie eine signifikant verstärkte Translokation der inflammatorischen Transkriptionsfaktoren STAT3 und NF-IL6 in die Zellkerne von Neuronen nachgewiesen werden. Für NF-IL6 war ein verstärktes nukleäres Signal auch in Makrophagen der Kultur detektierbar. Durch den Einsatz von Cisplatin wurde die Anzahl der Makrophagen signifikant reduziert und das Wachstum von Satellitenglia-Zellen gehemmt, ohne dabei die Vitalität und Stimulus-induzierte Responsivität der Neurone zu beeinflussen. Durch

diese Reduktion peripherer Gliazellen wurde die Zytokinbildung in der Primärzellkultur nach LPS-Stimulation signifikant vermindert. Daneben führte die LPS-Stimulation durch zusätzlichen Einsatz von Cisplatin nicht mehr zu einem signifikanten Anstieg der Capsaicin-Antwort. Die Sensibilisierung der Nozizeptoren wurde folglich ebenfalls unterdrückt. Mit Hilfe des Zellkulturmodells konnte somit die bedeutende Rolle von Satellitenglia-Zellen und Makrophagen für die Bildung inflammatorischer Mediatoren (TNF α , IL-6) und die Sensibilisierung nozizeptiver Neurone im Rahmen von Entzündungen dargestellt werden. Die Ergebnisse lassen sich insbesondere im Zusammenhang mit der Entwicklung von inflammatorischem sowie neuropathischem Schmerz diskutieren.

In einer weiteren Studie wurde der Einfluss von Gabapentinoide zum einen auf noxische, zum anderen auf inflammatorische Stimuli untersucht. Gabapentinoide werden als Schmerzmittel zur Therapie von neuropathischem Schmerz eingesetzt. Ihr genauer Wirkmechanismus wird jedoch nach wie vor kontrovers diskutiert. Er scheint aber sowohl antiinflammatorische, als auch antinozizeptive Komponenten (reduzierte Schmerzwahrnehmung / -weiterleitung / -übertragung) zu haben. Eine Inkubation der DRG Primärzellkultur mit Gabapentin bzw. Pregabalin führte nach zusätzlicher LPS-Stimulation zu einer signifikant reduzierten IL-6 Genexpression verglichen mit Zellkulturen, die mit keiner der Substanzen inkubiert worden sind. Für das an der PGE₂-Synthese beteiligte Enzym mPGES-1 konnte lediglich die Tendenz einer Reduktion durch Gabapentinoide gezeigt werden. Die Freisetzung von TNF α und IL-6 in die Überstände der Primärkulturen war zum Zeitpunkt der Messung nicht beeinflusst. Zusätzlich führte eine LPS-Stimulation in der nicht mit Gabapentinoide behandelten Gruppe zu einer Steigerung der Genexpression des TRPV1. Zu dieser LPS-induzierten Steigerung kam es nach Einsatz von Gabapentin bzw. Pregabalin nicht. Neben dem Effekt von Gabapentinoide auf die inflammatorische Antwort der DRG Primärzellkultur, wurde deren direkter Einfluss auf eine Stimulation mit den Agonisten des TRPV1 (Capsaicin) und TRPM8 (Menthol) untersucht. Dabei zeigte sich in einzelnen Neuronen eine reduzierte Capsaicin-Antwort und insgesamt reagierten weniger Neurone in der mit Pregabalin vorbehandelten Gruppe (69% vs. 81%). Es konnte somit gezeigt werden, dass Gabapentinoide in DRG Primärzellkulturen sowohl einen inhibierenden Einfluss auf die inflammatorische Antwort nach LPS-Stimulation, als auch auf die Zellantwort einzelner Neurone auf noxische Stimuli haben.

In einer dritten Studie wurden Zellen aus Primärzellkulturen des *Nucleus preopticus medianus* (MnPO) auf Kälte- und Wärme-Responsivität untersucht. Der MnPO gilt als zentrale Schaltstelle der Thermoregulation und erhält Informationen von Thermosensoren aus der Peripherie (z.B. aus freien Nervenendigungen in der Haut), aber auch aus verschiedenen zentralnervösen Strukturen. Diese eingehenden Reize werden dort auf efferente Neurone verschaltet, welche zur Aktivierung bzw. Unterdrückung von Wärmebildungs-, -verteilungs-, und -abgabemechanismen führen. Dadurch wird die Körpertemperatur auf einem konstanten Level gehalten. Zentrale Thermosensoren haben dabei vor allem eine Feedback-Funktion und sollen vor zu großen Temperaturschwankungen im ZNS schützen. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass im Bereich des MnPO nur eine geringe Anzahl an Kälte-responsiven Neuronen (2%) existiert. Diese zeigten kein Calcium-Signal auf eine Stimulation mit Menthol, weswegen eine Kälte-induzierte Aktivierung des TRPM8 auszuschließen ist. Ein für das zentrale Kälteempfinden verantwortlicher Kanal wurde bislang nicht aufgedeckt und auch die physiologische Bedeutung von Kälte-sensitiven Neuronen im Bereich des Hypothalamus wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Auf ein Erwärmen von 37 °C auf 45 °C zeigten 7,5% der Neurone einen schnellen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration. Hierbei handelt es sich um zentrale Warmsensoren. Darüber hinaus reagierten auf einen solchen Stimulus auch 9,5% der Astrozyten. Auf Capsaicin, als Agonisten am Hitze-sensitiven TRPV1, zeigten weder Neurone noch Astrozyten eine Zellantwort. Damit konnte gezeigt werden, dass sich Primärzellkulturen des MnPO zur Untersuchung der zentralen Thermosensitivität und möglicher Modulationen im Rahmen der Fieberentwicklung eignen.

F. SUMMARY

Perception of temperature and pain is essential for physiological homeostasis and protection against harmful stimuli. There are specific receptors in peripheral free nerve endings, which are able to detect those stimuli. Most of them belong to the *transient receptor potential* (TRP) family. Cell bodies of these free nerve endings are located in the dorsal root ganglia (DRG). Primary cell cultures from rat DRG consist of neurons (10%), satellite glial cells (80%) and a small number of macrophages (1%). They are widely used to investigate nociceptors and thermosensors on a cellular and molecular level.

In a first project, we aimed to examine the effects of specific somatosensory and inflammatory stimuli (cooling, warming, capsaicin, menthol, PGE₂) on cellular responses of single neurons by means of calcium imaging. We further determined the inflammatory response due to stimulation with lipopolysaccharide (LPS) and the specific contribution of the different cell types. In DRG cultures we identified about 75% of neurons responding to capsaicin, a TRPV1 agonist, with an increase of intracellular calcium ([Ca]_i) and therefore being characterized as putative nociceptors. About 10% of all investigated neurons showed Ca⁺⁺-signals due to stimulation with menthol, an agonist on TRPM8, and can therefore be classified as cold-sensors. Incubation with LPS (1 µg/ml), as inflammatory stimulus for 18h resulted in a significant increase of capsaicin responses and an enhanced number of neurons responding to noxious heat (45 °C). Such enhanced perception of painful stimuli is called sensitization and is present during inflammation or injury in peripheral nerves. Two of the most important inflammatory mediators during this process are tumor necrosis factor alpha (TNFα) and interleukin 6 (IL-6). In LPS-stimulated DRG cell cultures there was a significant increase in expression and release of both cytokines into the supernatants. Immunocytochemistry revealed an increase of specific TNFα-signals in the *trans*-Golgi network of macrophages. Besides we could show that inflammatory transcription factors, STAT3 and NF-IL6, are translocated into the nuclei of DRG neurons, resulting in a significantly increased nuclear signal. NF-IL6 signals were significantly enhanced also in nuclei of macrophages. Using cisplatin, a cytostatic pharmacologic agent, we significantly reduced the number of macrophages in cell cultures and inhibited the growth of satellite glial cells. This reduction of

macrophages and inhibition of glial cells lead to a reduced inflammatory response within DRG primary cultures. LPS-induced increases of TNF α - and IL-6 release were blunted due to incubation with cisplatin. In Ca⁺⁺-imaging experiments the LPS-induced increase of capsaicin responses was reduced. A nociceptor sensitizing effect of LPS was therefore diminished by depletion of peripheral glial cells. Using DRG primary cell cultures we were able to show the outstanding role of satellite glial cells and macrophages for production and release of proinflammatory mediators (TNF α and IL-6) and their function in sensitization of peripheral nociceptors.

In a further study we aimed to investigate the effects of gabapentinoids on DRG primary cell cultures during noxious or inflammatory stimulation. Gabapentinoids, such as Gabapentin and Pregabalin, are drugs used for pain management in patients suffering from neuropathic pain. But the mechanisms of action of these drugs are still just poorly understood. There seem to be antiinflammatory as well as antinociceptive mechanisms involved in the pain-relieving effect of these drugs. Incubation of DRG primary cultures with Gabapentin or Pregabalin resulted in a significantly decreased expression of IL-6 after LPS-stimulation. There also was a tendency for reduced mRNA levels for mPGES-1. The release of TNF α and IL-6 into the supernatants of the cultures was not impaired at the investigated point of time. In addition there was an increased expression of TRPV1 due to stimulation with LPS. This LPS-induced increase could not be detected in groups pretreated with one of the gabapentinoids. Gabapentin and Pregabalin thus seem to exert an antiinflammatory effect on DRG primary cell cultures during LPS stimulation. In another experimental setup we aimed to investigate effects of gabapentinoids on putative nociceptors and cold-sensors. Therefore we performed Ca⁺⁺-imaging experiments and used capsaicin, a TRPV1 agonist, and menthol, a TRPM8 agonist, to examine possible changes in cellular responses. Single neurons showed a decreased capsaicin-response and the number of capsaicin-responsive neurons was decreased after incubation with Pregabalin (69% vs. 81%). We were able to show that there is a moderate influence of incubation with gabapentinoids on the inflammatory response of DRG primary cultures and on capsaicin-responses of single DRG neurons.

In a third study we investigated cells from MnPO (*Nucleus preopticus medianus*) primary cell cultures regarding their responsiveness to cold- or warm stimulation. The MnPO is the most important central thermoregulatory structure and receives thermal information from peripheral as well as central thermosensors to initiate appropriate regulatory

mechanisms. Central thermosensors have a feedback function to protect the central nervous system from temperature variations. In our study we were able to detect a small number of putative central cold-sensors (2% of all investigated neurons). Because they did not respond to menthol, a TRPM8 agonist, the involvement of this cold-detecting channel is unlikely. The responsible channel for central cold-sensitivity is still unknown and its physiological function within the hypothalamus is still discussed controversially. About 7.5% of all investigated neurons showed a rapid and pronounced cellular response due to warming from 37 °C to 45 °C. These neurons are putative warm-sensors. There was also a population of astrocytes (9.5%) responding to warmth. None of the investigated neurons and astrocytes showed any response due to stimulation with capsaicin, a TRPV1 agonist. Thus, an involvement of heat-sensitive TRPV1 channel in detecting warm temperatures in the MnPO is unlikely. We were able to show, that primary cell cultures of MnPO are a useful tool to investigate central thermosensitivity and possible modulations during systemic inflammation and the development of fever.

G. LITERATUR

Abe, Junji; Hosokawa, Hiroshi; Okazawa, Makoto; Kandachi, Mikako; Sawada, Yosuke; Yamanaka, Keiji et al. (2005): TRPM8 protein localization in trigeminal ganglion and taste papillae. In: *Brain Research. Molecular Brain Research* 136 (1-2), S. 91–98. DOI: 10.1016/j.molbrainres.2005.01.013.

Abe, Junji; Okazawa, Makoto; Adachi, Ryutaro; Matsumura, Kiyoshi; Kobayashi, Shigeo (2003): Primary cold-sensitive neurons in acutely dissociated cells of rat hypothalamus. In: *Neuroscience letters* 342 (1-2), S. 29–32. DOI: 10.1016/S0304-3940(03)00239-8.

Akira, S. (1997): IL-6-regulated transcription factors. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29 (12), S. 1401–1418.

Akira, S.; Isshiki, H.; Sugita, T.; Tanabe, O.; Kinoshita, S.; Nishio, Y. et al. (1990): A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. In: *The EMBO Journal* 9 (6), S. 1897–1906.

Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Morgan, David; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter (2017): *Molekularbiologie der Zelle*. 6. Auflage. Hg. v. Ulrich Schäfer. Weinheim: Wiley-VCH. Online verfügbar unter <http://ebookcentral.proquest.com/lib/gbv/detail.action?docID=4856334>.

Alden, Kris J.; Garcia, Jesus (2001): Differential effect of gabapentin on neuronal and muscle calcium currents. In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (297), S. 727–736.

Al-Khater, Khulood M.; Kerr, Robert; Todd, Andrew J. (2008): A quantitative study of spinothalamic neurons in laminae I, III, and IV in lumbar and cervical segments of the rat spinal cord. In: *The Journal of Comparative Neurology* 511 (1), S. 1–18. DOI: 10.1002/cne.21811.

Al-Khater, Khulood M.; Todd, Andrew J. (2009): Collateral projections of neurons in laminae I, III, and IV of rat spinal cord to thalamus, periaqueductal gray matter, and lateral parabrachial area. In: *The Journal of Comparative Neurology* 515 (6), S. 629–646. DOI: 10.1002/cne.22081.

Alter, Benedict J.; Gereau, Robert W. (2008): Hotheaded: TRPV1 as mediator of hippocampal synaptic plasticity. In: *Neuron* 57 (5), S. 629–631. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.02.023.

Amaya, F.; Decosterd, I.; Samad, T. A.; Plumptre, C.; Tate, S.; Mannion, R. J. et al. (2000): Diversity of expression of the sensory neuron-specific TTX-resistant voltage-gated sodium ion channels SNS and SNS2. In: *Molecular and Cellular Neurosciences* 15 (4), S. 331–342. DOI: 10.1006/mcne.1999.0828.

Andratsch, Manfred; Mair, Norbert; Constantin, Cristina E.; Scherbakov, Nadja; Benetti, Camilla; Quarta, Serena et al. (2009): A key role for gp130 expressed on peripheral sensory nerves in pathological pain. In: *The Journal of Neuroscience: The official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (43), S. 13473–13483. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1822-09.2009.

- Andrew, D.; Craig, A. D. (2001): Spinothalamic lamina I neurones selectively responsive to cutaneous warming in cats. In: *The Journal of Physiology* 537 (2), S. 489–495. DOI: 10.1111/j.1469-7793.2001.00489.x.
- Anfuso, Carmelina D.; Olivieri, Melania; Fidilio, Annamaria; Lupo, Gabriella; Rusciano, Dario; Pezzino, Salvatore et al. (2017): Gabapentin Attenuates Ocular Inflammation: In vitro and In vivo Studies. In: *Frontiers in Pharmacology* 8, S. 173. DOI: 10.3389/fphar.2017.00173.
- Arango Duque, Guillermo; Descoteaux, Albert (2014): Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. In: *Frontiers in Immunology* 5, S. 491. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00491.
- Baldwin, B. A.; Ingram, D. L. (1976): The effect of heating and cooling the hypothalamus on behavioural thermoregulation in the pig. In: *The Journal of Physiology* 191, S. 375–392.
- Bao, Yu-Hua; Zhou, Quan-Hong; Chen, Rui; Xu, Hao; Zeng, Lu-Lu; Zhang, Xin et al. (2014): Gabapentin enhances the morphine anti-nociceptive effect in neuropathic pain via the interleukin-10-heme oxygenase-1 signalling pathway in rats. In: *Journal of Molecular Neuroscience: MN* 54 (1), S. 137–146. DOI: 10.1007/s12031-014-0262-2.
- Basbaum, Allan I.; Bautista, Diana M.; Scherrer, Grégory; Julius, David (2009): Cellular and molecular mechanisms of pain. In: *Cell* 139 (2), S. 267–284. DOI: 10.1016/j.cell.2009.09.028.
- Baud, Véronique; Karin, Michael (2001): Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. In: *Trends in Cell Biology* 11 (9), S. 372–377. DOI: 10.1016/S0962-8924(01)02064-5.
- Bauer, Claudia S.; Nieto-Rostro, Manuela; Rahman, Wahida; Tran-Van-Minh, Alexandra; Ferron, Laurent; Douglas, Leon et al. (2009): The increased trafficking of the calcium channel subunit $\alpha 2\delta$ -1 to presynaptic terminals in neuropathic pain is inhibited by the $\alpha 2\delta$ ligand pregabalin. In: *The Journal of Neuroscience: The official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (13), S. 4076–4088. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0356-09.2009.
- Baumgärtner, U. (2010): Nozizeptives System : Nozizeptoren, Fasertypen, spinale Bahnen und Projektionsareale. In: *Schmerz (Berlin, Germany)* 24 (2), S. 105–113. DOI: 10.1007/s00482-010-0904-4.
- Bautista, Diana M.; Siemens, Jan; Glazer, Joshua M.; Tsuruda, Pamela R.; Basbaum, Allan I.; Stucky, Cheryl L. et al. (2007): The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. In: *Nature* 448 (7150), S. 204–208. DOI: 10.1038/nature05910.
- Behrends, Jan C.; Bischofberger, Josef; Deutzmann, Rainer; Ehmke, Heimo; Frings, Stephan; Grissmer, Stephan et al. (2017): Physiologie. 3., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).
- Bester, H.; Chapman, V.; Besson, J. M.; Bernard, J. F. (2000): Physiological properties of the lamina I spinoparabrachial neurons in the rat. In: *Journal of Neurophysiology* 83 (4), S. 2239–2259. DOI: 10.1152/jn.2000.83.4.2239.
- Bhave, Gautam; Gereau, Robert W. (2004): Posttranslational mechanisms of peripheral sensitization. In: *Journal of Neurobiology* 61 (1), S. 88–106. DOI: 10.1002/neu.20083.

- Bhave, Gautam; Hu, Hui-Juan; Glauner, Kathi S.; Zhu, Weiguo; Wang, Haibin; Brasier, D. J. et al. (2003): Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (21), S. 12480–12485. DOI: 10.1073/pnas.2032100100.
- Bley, K. R.; Hunter, J. C.; Eglén, R. M.; Smith, J.A.M. (1998): The role of IP prostanoïd receptors in inflammatory pain. In: *Trends in Pharmacological Sciences* 19 (4), S. 141–147. DOI: 10.1016/S0165-6147(98)01185-7.
- Blum, E.; Procacci, P.; Conte, V.; Hanani, M. (2014): Systemic inflammation alters satellite glial cell function and structure. A possible contribution to pain. In: *Neuroscience* 274, S. 209–217. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.05.029.
- Bonnington, Jennifer K.; McNaughton, Peter A. (2003): Signalling pathways involved in the sensitisation of mouse nociceptive neurones by nerve growth factor. In: *The Journal of Physiology* 551 (Pt 2), S. 433–446. DOI: 10.1113/jphysiol.2003.039990.
- Boscan, Pedro; Pickering, Anthony E.; Paton, Julian F. R. (2002): The Nucleus of the Solitary Tract: An Integrating Station for Nociceptive and Cardiorespiratory Afferents. In: *Experimental Physiology* 87 (2), S. 259–266. DOI: 10.1113/eph8702353.
- Boulant, Jack A. (2000): Role of the Preoptic-Anterior Hypothalamus in Thermoregulation and Fever. In: *Clinical Infectious Diseases* 31 (157-161).
- Boyette-Davis, Jessica A.; Walters, Edgar T.; Dougherty, Patrick M. (2015): Mechanisms involved in the development of chemotherapy-induced neuropathy. In: *Pain Management* 5 (4), S. 285–296. DOI: 10.2217/pmt.15.19.
- Bratincsák, A.; Palkovits, M. (2004): Activation of brain areas in rat following warm and cold ambient exposure. In: *Neuroscience* 127 (2), S. 385–397. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2004.05.016.
- Brauchi, Sebastian; Orta, Gerardo; Salazar, Marcelo; Rosenmann, Eduardo; Latorre, Ramon (2006): A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. In: *The Journal of Neuroscience: The official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (18), S. 4835–4840. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5080-05.2006.
- Braun, H. A.; Bade, H.; Hensel, H. (1980): Static and Dynamic Discharge Patterns of Bursting Cold Fibers Related to Hypothetical Receptor Mechanisms. In: *European Journal of Physiology* 386, S. 1–9.
- Brock, James A.; McAllen, Robin M. (2016): Spinal cord thermosensitivity: An afferent phenomenon? In: *Temperature* 3 (2), S. 232–239. DOI: 10.1080/23328940.2016.1157665.
- Bron, Romke; Klesse, Laura J.; Shah, Kirti; Parada, Luis F.; Winter, Janet (2003): Activation of Ras is necessary and sufficient for upregulation of vanilloid receptor type 1 in sensory neurons by neurotrophic factors. In: *Molecular and Cellular Neuroscience* 22 (1), S. 118–132. DOI: 10.1016/S1044-7431(02)00022-2.
- Buck, Steven H.; Burks, Thomas F. (1986): The Neuropharmacology of Capsaicin: Review of Some Recent Observations. In: *Pharmacological Reviews* 38 (3), S. 179–226.

- Carlisle, H. J.; Ingram, D. L. (1973): The effects of heating and cooling the spinal cord and hypothalamus on thermoregulatory behaviour in the pig. In: *The Journal of Physiology* 231, S. 353–364.
- Caterina, Michael J.; Leffler, A.; Malmberg, Annika B.; Martin, W. J.; Trafton, J.; Petersen-Zeit, K. R. et al. (2000): Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor. In: *Science* 288, S. 306–313.
- Caterina, Michael J.; Schumacher, Mark A.; Tominaga, Makoto; Rosen, Tobias A.; Levine, Jon D.; Julius, David (1997): The capsaicin receptor - a heat-activated ion channel in the pain pathway. In: *Nature* (389), S. 816–824.
- Cesare, P.; McNaughton, P. (1996): A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (26), S. 15435–15439. DOI: 10.1073/pnas.93.26.15435.
- Cesare, Paolo; Dekker, Lodewijk V.; Sardini, Alessandro; Parker, Peter J.; McNaughton, Peter A. (1999): Specific Involvement of PKC- ϵ in Sensitization of the Neuronal Response to Painful Heat. In: *Neuron* 23 (3), S. 617–624. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80813-2.
- Chai, C. Y.; Lin, M. T. (1972): Effects of heating and cooling the spinal cord and medulla oblongata on thermoregulation in monkeys. In: *The Journal of Physiology* 225, S. 297–308.
- Chen, Guoqing; Goeddel, David V. (2002): TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. In: *Science* 296 (5573), S. 1634–1635. DOI: 10.1126/science.1071924.
- Cheng, Jen-Kun; Ji, Ru-Rong (2008): Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. In: *Neurochemical Research* 33 (10), S. 1970–1978. DOI: 10.1007/s11064-008-9711-z.
- Chuang, Huai-hu; Neuhauser, Werner M.; Julius, David (2004): The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel. In: *Neuron* 43 (6), S. 859–869. DOI: 10.1016/j.neuron.2004.08.038.
- Chung, Man-Kyo; Campbell, James N. (2016): Use of Capsaicin to Treat Pain: Mechanistic and Therapeutic Considerations. In: *Pharmaceuticals* 9 (4). DOI: 10.3390/ph9040066.
- Clapham, David E. (2003): TRP channels as cellular sensors. In: *Nature* 426 (6966), S. 517–524. DOI: 10.1038/nature02196.
- Colburn, Raymond W.; Lubin, Mary Lou; Stone, Dennis J.; Wang, Yan; Lawrence, Danielle; D'Andrea, Michael R. et al. (2007): Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. In: *Neuron* 54 (3), S. 379–386. DOI: 10.1016/j.neuron.2007.04.017.
- Craig, A. D. (2002): How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. In: *Nature reviews. Neuroscience* 3 (8), S. 655–666. DOI: 10.1038/nrn894.
- Craig, A. D.; Bushnell, M. C.; Zhang, E. T.; Blomqvist, A. (1994): A thalamic nucleus specific for pain and temperature sensation. In: *Nature* 372, S. 770–773.
- Craig, A. D.; Krout, K.; Andrew, D. (2001): Quantitative response characteristics of thermoreceptive and nociceptive lamina I spinothalamic neurons in the cat. In: *Journal of Neurophysiology* 86 (3), S. 1459–1480. DOI: 10.1152/jn.2001.86.3.1459.

- Cristino, L.; Petrocellis, L. de; Pryce, G.; Baker, D.; Guglielmotti, V.; Di Marzo, V. (2006): Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. In: *Neuroscience* 139 (4), S. 1405–1415. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.02.074.
- Cunningham, Mark O.; Woodhall, Gavin L.; Thompson, Sarah E.; Dooley, David J.; Jones, Roland S. G. (2004): Dual effects of gabapentin and pregabalin on glutamate release at rat entorhinal synapses in vitro. In: *European Journal of Neuroscience* 20 (6), S. 1566–1576. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2004.03625.x.
- Damm, J.; Wiegand, F.; Harden, L. M.; Gerstberger, R.; Rummel, C.; Roth, J. (2012): Fever, sickness behavior, and expression of inflammatory genes in the hypothalamus after systemic and localized subcutaneous stimulation of rats with the Toll-like receptor 7 agonist imiquimod. In: *Neuroscience* 201, S. 166–183. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.11.013.
- Damm, Jelena; Harden, Lois May; Gerstberger, Rüdiger; Roth, Joachim; Rummel, Christoph (2013): The putative JAK-STAT inhibitor AG490 exacerbates LPS-fever, reduces sickness behavior, and alters the expression of pro- and anti-inflammatory genes in the rat brain. In: *Neuropharmacology* 71, S. 98–111. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.03.014.
- Damm, Jelena; Roth, Joachim; Gerstberger, Rüdiger; Rummel, Christoph (2017): The use of siRNA as a pharmacological tool to assess a role for the transcription factor NF-IL6 in the brain under in vitro and in vivo conditions during LPS-induced inflammatory stimulation. In: *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* 28 (6): 563–571.
- Daniels, Richard L.; Takashima, Yoshio; McKemy, David D. (2009): Activity of the neuronal cold sensor TRPM8 is regulated by phospholipase C via the phospholipid phosphoinositol 4,5-bisphosphate. In: *The Journal of Biological Chemistry* 284 (3), S. 1570–1582. DOI: 10.1074/jbc.M807270200.
- Dasari, Shaloam; Tchounwou, Paul Bernard (2014): Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. In: *European Journal of Pharmacology* 740, S. 364–378. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
- De Vito, V.; Salvadori, M.; Poapolathep, A.; Owen, H.; Rychshanova, R.; Giorgi, M. (2017): Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of grapiprant in a carrageenan-induced inflammatory pain model in the rabbit. In: *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 40 (5), S. 468–475. DOI: 10.1111/jvp.12380.
- Dhaka, Ajay; Earley, Taryn J.; Watson, James; Patapoutian, Ardem (2008): Visualizing cold spots: TRPM8-expressing sensory neurons and their projections. In: *The Journal of Neuroscience: The official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (3), S. 566–575. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3976-07.2008.
- Dhaka, Ajay; Murray, Amber N.; Mathur, Jayanti; Earley, Taryn J.; Petrus, Matt J.; Patapoutian, Ardem (2007): TRPM8 is required for cold sensation in mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 54 (3), S. 371–378. DOI: 10.1016/j.neuron.2007.02.024.
- Dhaka, Ajay; Uzzell, Valerie; Dubin, Adrienne E.; Mathur, Jayanti; Petrus, Matt; Bandell, Michael; Patapoutian, Ardem (2009): TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. In: *The Journal of Neuroscience: The official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (1), S. 153–158. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4901-08.2009.

- Dhaka, Ajay; Viswanath, Veena; Patapoutian, Ardem (2006): Trp ion channels and temperature sensation. In: *Annual Review of Neuroscience* 29, S. 135–161. DOI: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112958.
- Dias, Jordana Maia; Brito, Tarcisio Vieira de; Aguiar Magalhães, Diva de; da Silva Santos, Pammela Weryka; Batista, Jalles Arruda; do Nascimento Dias, Eulina Gabriela et al. (2014): Gabapentin, a synthetic analogue of gamma aminobutyric acid, reverses systemic acute inflammation and oxidative stress in mice. In: *Inflammation* 37 (5), S. 1826–1836. DOI: 10.1007/s10753-014-9913-2.
- Dib-Hajj, Sulayman D.; Black, Joel A.; Waxman, Stephen G. (2009): Voltage-gated sodium channels: therapeutic targets for pain. In: *Pain Medicine* 10 (7), S. 1260–1269. DOI: 10.1111/j.1526-4637.2009.00719.x.
- Dinakar, Pradeep; Stillman, Alexandra Marion (2016): Pathogenesis of Pain. In: *Seminars in Pediatric Neurology* 23 (3), S. 201–208. DOI: 10.1016/j.spen.2016.10.003.
- Diogenes, A.; Ferraz, C. C. R.; Akopian, A. N.; Henry, M. A.; Hargreaves, K. M. (2011): LPS sensitizes TRPV1 via activation of TLR4 in trigeminal sensory neurons. In: *Journal of Dental Research* 90 (6), S. 759–764. DOI: 10.1177/0022034511400225.
- Doan, Lisa (2010): Voltage-gated calcium channels and pain. In: *Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management* 14 (2), S. 42–47. DOI: 10.1053/j.trap.2010.03.003.
- Doly, Stéphane; Fischer, Jacqueline; Salio, Chiara; Conrath, Marie (2004): The vanilloid receptor-1 is expressed in rat spinal dorsal horn astrocytes. In: *Neuroscience Letters* 357 (2), S. 123–126. DOI: 10.1016/j.neulet.2003.12.051.
- Doyle, C. A.; Hunt, S. P. (1999): A role for spinal lamina I neurokinin-1-positive neurons in cold thermoreception in the rat. In: *Neuroscience* 91 (2), S. 723–732. DOI: 10.1016/S0306-4522(98)00623-X.
- Dubin, Adrienne E.; Patapoutian, Ardem (2010): Nociceptors: the sensors of the pain pathway. In: *The Journal of Clinical Investigation* 120 (11), S. 3760–3772. DOI: 10.1172/JCI42843.
- EB (2010): Transdermales Capsaicin deaktiviert Nozizeptoren. In: *Deutsches Ärzteblatt* 107 (23), A 1173.
- Ellis, A.; Bennett, D. L. H. (2013): Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. In: *British Journal of Anaesthesia* 111 (1), S. 26–37. DOI: 10.1093/bja/aet128.
- Emery, Edward C.; Luiz, Ana Paula; Wood, John N. (2016): Nav1.7 and other voltage-gated sodium channels as drug targets for pain relief. In: *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 20 (8), S. 975–983. DOI: 10.1517/14728222.2016.1162295.
- Emir, Tamara Luti Rosenbaum (Hg.) (2017): Neurobiology of TRP Channels. CRC Press/Taylor & Francis. 2. Aufl. Boca Raton (FL).
- England, S.; Bevan, S.; Docherty, R. J. (1996): PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. In: *The Journal of Physiology* 495 (2), S. 429–440. DOI: 10.1113/jphysiol.1996.sp021604.

European Medicines Agency (2018): Zusammenfassung des Europäischen Öffentlichen Beurteilungsberichts (EPAR) für Galliprant. EMA/734836/2017. Online verfügbar unter <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/galliprant>.

Evans, Angela R.; Nicol, Grant D.; Vasko, Michael R. (1996): Differential regulation of evoked peptide release by voltage-sensitive calcium channels in rat sensory neurons. In: *Brain Research* 712, S. 265–273.

Fang, Dong; Kong, Ling-Yu; Cai, Jie; Li, Song; Liu, Xiao-Dan; Han, Ji-Sheng; Xing, Guo-Gang (2015): Interleukin-6-mediated functional upregulation of TRPV1 receptors in dorsal root ganglion neurons through the activation of JAK/PI3K signaling pathway: roles in the development of bone cancer pain in a rat model. In: *Pain* 156 (6), S. 1124–1144. DOI: 10.1097/j.pain.000000000000158.

Field, Mark J.; Cox, Peter J.; Stott, Emma; Melrose, Heather; Offord, James; Su, Ti-Zhi et al. (2006): Identification of the alpha2-delta-1 subunit of voltage-dependent calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (46), S. 17537–17542.

Fitzgerald, E. M.; Okuse, K.; Wood, J. N.; Dolphin, A. C.; Moss, S. J. (1999): cAMP-dependent phosphorylation of the tetrodotoxin-resistant voltage-dependent sodium channel SNS. In: *The Journal of Physiology* 516.2, S. 433–446.

Frias, Bárbara; Merighi, Adalberto (2016): Capsaicin, Nociception and Pain. In: *Molecules* 21 (6). DOI: 10.3390/molecules21060797.

Fuchs, Franziska; Damm, Jelena; Gerstberger, Rüdiger; Roth, Joachim; Rummel, Christoph (2013): Activation of the inflammatory transcription factor nuclear factor interleukin-6 during inflammatory and psychological stress in the brain. In: *Journal of Neuroinflammation* 10, S. 140. DOI: 10.1186/1742-2094-10-140.

Fukumoto, N.; Obama, Y.; Kitamura, N.; Niimi, K.; Takahashi, E.; Itakura, C.; Shibuya, I. (2009): Hypoalgesic behaviors of P/Q-type voltage-gated Ca²⁺ channel mutant mouse, rolling mouse Nagoya. In: *Neuroscience* 160 (1), S. 165–173. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.02.032.

Galoyan, Samuel M.; Petruska, Jeffrey C.; Mendell, Lorne M. (2003): Mechanisms of sensitization of the response of single dorsal root ganglion cells from adult rat to noxious heat. In: *European Journal of Neuroscience* 18 (3), S. 535–541. DOI: 10.1046/j.1460-9568.2003.02775.x.

Gama, Kelly Barbosa; Santos, Dourivaldo Silva; Evangelista, Afrânio Ferreira; Silva, Daniela Nascimento; Alcântara, Adriano Costa de; Dos Santos, Ricardo Ribeiro et al. (2018): Conditioned Medium of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells as a Therapeutic Approach to Neuropathic Pain: A Preclinical Evaluation. In: *Stem Cells International* 2018, S. 8179013. DOI: 10.1155/2018/8179013.

Gauriau, Caroline; Bernard, Jean-François (2002): Pain Pathways and Parabrachial Circuits in the Rat. In: *Experimental Physiology* 87 (2), S. 251–258. DOI: 10.1113/eph8702357.

Gavva, Narendra R. (2008): Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1. In: *Trends in Pharmacological Sciences* 29 (11), S. 550–557. DOI: 10.1016/j.tips.2008.08.003.

- Gavva, Narendra R.; Bannon, Anthony W.; Surapaneni, Sekhar; Hovland, David N.; Lehto, Sonya G.; Gore, Anu et al. (2007): The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. In: *The Journal of Neuroscience: The official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (13), S. 3366–3374. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4833-06.2007.
- Gibson, Helen E.; Edwards, Jeffrey G.; Page, Rachel S.; van Hook, Matthew J.; Kauer, Julie A. (2008): TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal interneurons. In: *Neuron* 57 (5), S. 746–759. DOI: 10.1016/j.neuron.2007.12.027.
- Gold, M. S.; Dastmalchi, S.; Levine, J. D. (1996a): Co-expression of nociceptor properties in dorsal root ganglion neurons from the adult rat in vitro. In: *Neuroscience* 71 (1), S. 265–275. DOI: 10.1016/0306-4522(95)00433-5.
- Gold, M. S.; Reichling, D. B.; Shuster, M. J.; Levine, J. D. (1996b): Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (3), S. 1108–1112. DOI: 10.1073/pnas.93.3.1108.
- Graham, B. A.; Brichta, A. M.; Callister, R. J. (2007): Moving from an averaged to specific view of spinal cord pain processing circuits. In: *Journal of Neurophysiology* 98 (3), S. 1057–1063. DOI: 10.1152/jn.00581.2007.
- Gregg, Richard W.; Molepo, J. Matshela; Monpetit, Vital J.A.; Mikael, Nadia Z.; Redmond, Deidre; Gadia, Mahendra; Stewart, David J. (1992): Cisplatin neurotoxicity: the relationship between dosage, time, and platinum concentration in neurologic tissues, and morphologic evidence of toxicity. In: *Journal of Clinical Oncology* (10), S. 795–803.
- Hamann, Melanie (2017): Gabapentinoide - Die neuen Wundermittel in der Schmerztherapie? In: *kleintier.konkret* (2), S. 3–8.
- Hamza, May; Dionne, Raymond A. (2009): Mechanisms of Non-Opioid Analgesics Beyond Cyclooxygenase Enzyme Inhibition. In: *Current Molecular Pharmacology* (2), S. 1–14.
- Hanani, Menachem (2005): Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. In: *Brain Research. Brain Research Reviews* 48 (3), S. 457–476. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2004.09.001.
- Harré, Eva-Maria; Roth, Joachim; Pehl, Ulrich; Kueth, Matthias; Gerstberger, Rüdiger; Hübschle, Thomas (2002): Selected contribution: role of IL-6 in LPS-induced nuclear STAT3 translocation in sensory circumventricular organs during fever in rats. In: *Journal of Applied Physiology* 92 (6), S. 2657–2666. DOI: 10.1152/japplphysiol.00822.2001.
- Hayes, Ann G.; Oxford, A.; Reynolds, Mandy; Shingler, A. H.; Skingle, M.; Smith, C.; Tyers, M. B. (1984): The effects of a series of capsaicin analogues on nociception and body temperature in the rat. In: *Life Sciences* 34, S. 1241–1248.
- Heinrich, P. C.; Behrmann, I.; Müller-Newen, G.; Schaper, F.; Graeve, L. (1998): Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. In: *The Biochemical Journal* 334 (Pt 2), S. 297–314.
- Heinricher, M. M.; Tavares, I.; Leith, J. L.; Lumb, B. M. (2009): Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. In: *Brain Research Reviews* 60 (1), S. 214–225. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2008.12.009.

- Hendrich, Jan; van Tran Minh, Alexandra; Heblich, Fay; Nieto-Rostro, Manuela; Watschinger, Katrin; Striessnig, Jörg et al. (2008): Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the $\alpha 2\delta$ ligand gabapentin. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (9), S. 3628–3633.
- Hensellek, Susanne; Brell, Patrice; Schaible, Hans-Georg; Bräuer, Rolf; Segond von Banchet, Gisela (2007): The cytokine TNF α increases the proportion of DRG neurones expressing the TRPV1 receptor via the TNFR1 receptor and ERK activation. In: *Molecular and Cellular Neurosciences* 36 (3), S. 381–391. DOI: 10.1016/j.mcn.2007.07.010.
- Hori, Tetsuro (1984): Capsaicin and central control of thermoregulation. In: *Pharmacology & Therapeutics* 26, S. 389–416.
- Hori, Tetsuro; Nakashima, Toshihiro; Toshikazu, Kiyohara; Shibata, Masaaki (1982): Comparison of anterior hypothalamic and preoptic thermosensitive neurons in vitro. In: *Neuroscience Letters* 31, S. 283–288.
- Hori, Tetsuro; Shinohara, Katsuaki (1979): Hypothalamic thermo-responsive neurones in the new-born rat. In: *The Journal of Physiology* (294), S. 541–560.
- Horie, Ryouichi; Ishida, Takaomi; Maruyama-Nagai, Masae; Ito, Kinji; Watanabe, Mariko; Yoneyama, Akiko et al. (2007): TRAF activation of C/EBP β (NF-IL6) via p38 MAPK induces HIV-1 gene expression in monocytes/macrophages. In: *Microbes and Infection* 9 (6), S. 721–728. DOI: 10.1016/j.micinf.2007.02.017.
- Hu, Ping; McLachlan, Elspeth M. (2003): Distinct functional types of macrophage in dorsal root ganglia and spinal nerves proximal to sciatic and spinal nerve transections in the rat. In: *Experimental Neurology* 184 (2), S. 590–605. DOI: 10.1016/S0014-4886(03)00307-8.
- Huang, Jiehong; Zhang, Xuming; McNaughton, Peter (2006a): Inflammatory Pain: The Cellular Basis of Heat Hyperalgesia. In: *CN* 4 (3), S. 197–206. DOI: 10.2174/157015906778019554.
- Huang, Jiehong; Zhang, Xuming; McNaughton, Peter A. (2006b): Modulation of temperature-sensitive TRP channels. In: *Seminars in Cell & Developmental Biology* 17 (6), S. 638–645. DOI: 10.1016/j.semcdb.2006.11.002.
- Hwang, Se Jin; Burette, Alain; Valtschanoff, Juli G. (2003): VR1-positive primary afferents contact NK1-positive spinoparabrachial neurons. In: *The Journal of Comparative Neurology* 460 (2), S. 255–265. DOI: 10.1002/cne.10647.
- Iida, Tohko; Shimizu, Isao; Nealen, Michele L.; Campbell, Ashley; Caterina, Michael (2005): Attenuated fever response in mice lacking TRPV1. In: *Neuroscience Letters* 378 (1), S. 28–33. DOI: 10.1016/j.neulet.2004.12.007.
- Inczedy-Marcsek, Margit; Hsu, Linda; Lindner, Erich (1993): An analysis of dorsal root ganglia differentiation using three tissue culture systems. In: *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 29A, S. 661–670.
- Guieu, J. D. and Hardy, J. D. (1970): Effects of heating and cooling of the spinal cord on preoptic unit activity. In: *Journal of Applied Physiology* 29 (5), S. 675–683.
- Jacobs, Jean M.; Macfarlane, Rhona M.; Cavanagh, J. B. (1976): Vascular leakage in the dorsal root ganglia of the rat, studied with horseradish peroxidase. In: *Journal of the Neurological Sciences* 29 (1), S. 95–107. DOI: 10.1016/0022-510X(76)90083-6.

- Jaggi, Amteshwar Singh; Jain, Vivek; Singh, Nirmal (2011): Animal models of neuropathic pain. In: *Fundamental & Clinical Pharmacology* 25 (1), S. 1–28. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2009.00801.x.
- Jancsó-Gábor, Aurelia; Szolcsányi, J.; Jancsó, N. (1970a): Stimulation and desensitization of the hypothalamic heatsensitive structures by capsaicin in rats. In: *The Journal of Physiology*, S. 449–459.
- Jancsó-Gábor, Aurelia; Szolcsányi, János; Jancsó, N. (1970b): Irreversible impairment of thermoregulation induced by capsaicin and pungent substances in rats and guinea-pigs. In: *The Journal of Physiology* 206, S. 495–507.
- Jara-Oseguera, Andrés; Simon, Sidney A.; Rosenbaum, Tamara (2008): TRPV1: On the road to pain relief. In: *Current Molecular Pharmacology* 1 (3), S. 255–269.
- Jeftinija, Srdija; Liu, Fang; Jeftinija, Ksenija; Urban, Laszlo (1992): Effect of capsaicin and resiniferatoxin on peptidergic neurons in cultured dorsal root ganglion. In: *Regulatory Peptides* 39, S. 123–135.
- Jendryke, Thomas; Prochazkova, Michaela; Hall, Bradford E.; Nordmann, Grégory C.; Schladt, Moritz; Milenkovic, Vladimir M. et al. (2016): TRPV1 function is modulated by Cdk5-mediated phosphorylation: insights into the molecular mechanism of nociception. In: *Scientific Reports* 6, S. 22007. DOI: 10.1038/srep22007.
- Ji, Ru-Rong; Chamessian, Alexander; Zhang, Yu-Qiu (2016): Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. In: *Science* 354, S. 572–577.
- Ji, Ru-Rong; Samad, Tarek A.; Jin, Shan-Xue; Schmoll, Raymond; Woolf, Clifford J. (2002): p38 MAPK Activation by NGF in Primary Sensory Neurons after Inflammation Increases TRPV1 Levels and Maintains Heat Hyperalgesia. In: *Neuron* 36 (1), S. 57–68. DOI: 10.1016/S0896-6273(02)00908-X.
- Jiang, Yanlin; Guo, Chunlu; Vasko, Michael R.; Kelley, Mark R. (2008): Implications of apurinic/apyrimidinic endonuclease in reactive oxygen signaling response after cisplatin treatment of dorsal root ganglion neurons. In: *Cancer Research* 68 (15), S. 6425–6434. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1173.
- Jin, Xiaochun; Gereau, Robert W. (2006): Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor- α . In: *The Journal of Neuroscience: The official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (1), S. 246–255. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3858-05.2006.
- Jin, You-Hong; Yamaki, Fumiko; Takemura, Motohide; Koike, Yuichi; Furuyama, Akira; Yonehara, Norifumi (2009): Capsaicin-induced glutamate release is implicated in nociceptive processing through activation of ionotropic glutamate receptors and group I metabotropic glutamate receptor in primary afferent fibers. In: *Journal of Pharmacological Sciences* 109 (2), S. 233–241.
- Jordt, Sven-Eric; Julius, David (2002): Molecular Basis for Species-Specific Sensitivity to "Hot" Chili Peppers. In: *Cell* 108, S. 421–430.
- Karlsson, Urban; Sundgren-Andersson, Anna K.; Johansson, Staffan; Krupp, Johannes J. (2005): Capsaicin augments synaptic transmission in the rat medial preoptic nucleus. In: *Brain Research* 1043 (1-2), S. 1–11. DOI: 10.1016/j.brainres.2004.10.064.
- Kauer, Julie A.; Gibson, Helen E. (2009): Hot flash: TRPV channels in the brain. In: *Trends in Neurosciences* 32 (4), S. 215–224. DOI: 10.1016/j.tins.2008.12.006.

- Kelso, S. R.; Perlmutter, M. N.; Boulant, Jack A. (1982): Thermosensitive single-unit activity of in vitro hypothalamic slices. In: *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 242 (11), R77-R84.
- Khan, A. A.; Diogenes, A.; Jeske, N. A.; Henry, M. A.; Akopian, A.; Hargreaves, K. M. (2008): Tumor necrosis factor alpha enhances the sensitivity of rat trigeminal neurons to capsaicin. In: *Neuroscience* 155 (2), S. 503–509. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.05.036.
- Kielian, Tammy (2006): Toll-like Receptors in Central Nervous System Glial Inflammation and Homeostasis. In: *Journal of Neuroscience Research* 83, S. 711–730.
- Kiguchi, Norikazu; Kobayashi, Yuka; Kishioka, Shiroh (2012): Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain. In: *Current Opinion in Pharmacology* 12 (1), S. 55–61. DOI: 10.1016/j.coph.2011.10.007.
- King, Glenn F.; Vetter, Irina (2014): No gain, no pain: NaV1.7 as an analgesic target. In: *ACS Chemical Neuroscience* 5 (9), S. 749–751. DOI: 10.1021/cn500171p.
- Kirkby Shaw, Kristin; Rausch-Derra, Lesley C.; Rhodes, Linda (2016): Grapiprant: an EP4 prostaglandin receptor antagonist and novel therapy for pain and inflammation. In: *Veterinary Medicine and Science* 2 (1), S. 3–9. DOI: 10.1002/vms3.13.
- Kirschstein, T.; Büsselberg, D.; Treede, R.-D (1997): Coexpression of heat-evoked and capsaicin-evoked inward currents in acutely dissociated rat dorsal root ganglion neurons. In: *Neuroscience Letters* 231 (1), S. 33–36. DOI: 10.1016/S0304-3940(97)00533-8.
- Kisseleva, T.; Bhattacharya, S.; Braunstein, J.; Schindler, C. W. (2002): Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. In: *Gene* 285 (1-2), S. 1–24.
- Kiyohara, Toshikazu; Miyata, Seiji; Nakamura, Takahiro; Shido, Osamu; Nakashima, Toshihiro; Shibata, Masaaki (1995): Differences in Fos expression in the rat brains between cold and warm ambient exposures. In: *Brain Research Bulletin* 38 (2), S. 193–201. DOI: 10.1016/0361-9230(95)00093-T.
- Knotkova, Helena; Pappagallo, Marco; Szallasi, Arpad (2008): Capsaicin (TRPV1 Agonist) Therapy for Pain Relief - Farewell or Revival? In: *The Clinical Journal of Pain* 24 (2), S. 142–154.
- Knowlton, Wendy M.; Daniels, Richard L.; Palkar, Radhika; McCoy, Daniel D.; McKemy, David D. (2011): Pharmacological blockade of TRPM8 ion channels alters cold and cold pain responses in mice. In: *PLOS ONE* 6 (9), e25894. DOI: 10.1371/journal.pone.0025894.
- Kobayashi, Akiko; Osaka, Toshimasa (2003): Involvement of the parabrachial nucleus in thermogenesis induced by environmental cooling in the rat. In: *European Journal of Physiology* 446 (6), S. 760–765. DOI: 10.1007/s00424-003-1119-7.
- Kobayashi, Shigeo (1986): Warm- and cold-sensitive neurons inactive at normal core temperature in rat hypothalamic slices. In: *Brain Research* 362 (1), S. 132–139. DOI: 10.1016/0006-8993(86)91406-X.
- Koplas, Patricia A.; Rosenberg, Robert L.; Oxford, Gerry S. (1997): The Role of Calcium in the Desensitization of Capsaicin Responses in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. In: *The Journal of Neuroscience* 17 (10), S. 3525–3537. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.17-10-03525.1997.

- Kukkar, Ankesh; Bali, Anjana; Singh, Nirmal; Jaggi, Amteshwar Singh (2013): Implications and mechanism of action of gabapentin in neuropathic pain. In: *Archives of Pharmacal Research* 36 (3), S. 237–251. DOI: 10.1007/s12272-013-0057-y.
- Ladak, A.; Olson, J.; Tredget, E. E.; Gordon, T. (2011): Differentiation of mesenchymal stem cells to support peripheral nerve regeneration in a rat model. In: *Experimental Neurology* 228 (2), S. 242–252. DOI: 10.1016/j.expneurol.2011.01.013.
- Laing, Robyn J.; Dhaka, Ajay (2016): ThermoTRPs and Pain. In: *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 22 (2), S. 171–187. DOI: 10.1177/1073858414567884.
- Lanneau, Christophe; Green, Andrew; Hirst, Warren D.; Wise, Alan; Brown, Jon T.; Donnier, Emmanuelle et al. (2001): Gabapentin is not a GABAB receptor agonist. In: *Neuropharmacology* 41, S. 965–975.
- Latorre, Ramón; Brauchi, Sebastián; Madrid, Rodolfo; Orio, Patricio (2011): A cool channel in cold transduction. In: *Physiology* 26 (4), S. 273–285. DOI: 10.1152/physiol.00004.2011.
- Lee, Byung-Sang; Jun, In-Gu; Kim, Sung-Hoon; Park, Jong Yeon (2013): Intrathecal gabapentin increases interleukin-10 expression and inhibits pro-inflammatory cytokine in a rat model of neuropathic pain. In: *Journal of Korean Medical Science* 28 (2), S. 308–314. DOI: 10.3346/jkms.2013.28.2.308.
- Lee, Kyung-Min; Jeon, Sang-Min; Cho, Hee-Jung (2009): Tumor necrosis factor receptor 1 induces interleukin-6 upregulation through NF-kappaB in a rat neuropathic pain model. In: *European Journal of Pain* 13 (8), S. 794–806. DOI: 10.1016/j.ejpain.2008.09.009.
- Li, Yanzhang; Ji, Ailing; Weihe, Eberhard; Schäfer, Martin K-H (2004): Cell-specific expression and lipopolysaccharide-induced regulation of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) and TNF receptors in rat dorsal root ganglion. In: *The Journal of Neuroscience: The official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (43), S. 9623–9631. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2392-04.2004.
- Li, Yunfeng; Liu, Guixiang; Li, Hao; Xu, Youzheng; Zhang, Hong; Liu, Zhen (2013): Capsaicin-induced activation of ERK1/2 and its involvement in GAP-43 expression and CGRP depletion in organotypically cultured DRG neurons. In: *Cellular and Molecular Neurobiology* 33 (3), S. 433–441. DOI: 10.1007/s10571-013-9909-8.
- Liebsch, Manfred; Grune, Barbara; Seiler, Andrea; Butzke, Daniel; Oelgeschläger, Michael; Pirow, Ralph et al. (2011): Alternatives to animal testing: current status and future perspectives. In: *Archives of Toxicology* 85 (8), S. 841–858. DOI: 10.1007/s00204-011-0718-x.
- Lieu, Zi Zhao; Lock, John G.; Hammond, Luke A.; La Gruta, Nicole L.; Stow, Jennifer L.; Gleeson, Paul A. (2008): A trans-Golgi network golgin is required for the regulated secretion of TNF in activated macrophages in vivo. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (9), S. 3351–3356. DOI: 10.1073/pnas.0800137105.
- Lima, Deolinda; Albino-Teixeira, António; Tavares, Isaura (2002): The Caudal Medullary Ventrolateral Reticular Formation in Nociceptive-Cardiovascular Integration. An Experimental Study in the Rat. In: *Experimental Physiology* 87 (2), S. 267–274. DOI: 10.1113/eph8702354.

- Lin, Cen-Hung; Wu, Sheng-Hua; Lee, Su-Shin; Lin, Yun-Nan; Kuo, Yur-Ren; Chai, Chee-Yin; Huang, Shu-Hung (2017): Autologous Adipose-Derived Stem Cells Reduce Burn-Induced Neuropathic Pain in a Rat Model. In: *International Journal of Molecular Sciences* 19 (1). DOI: 10.3390/ijms19010034.
- Lindsay, Ronald M.; Harmar, Anthony J. (1989): Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. In: *Nature* 337, S. 362–364.
- Linte, Ramona Madalina; Ciobanu, Cristian; Reid, Gordon; Babes, Alexandru (2007): Desensitization of cold- and menthol-sensitive rat dorsal root ganglion neurones by inflammatory mediators. In: *Experimental Brain Research* 178 (1), S. 89–98. DOI: 10.1007/s00221-006-0712-3.
- Liu, Beiyong; Qin, Feng (2005): Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. In: *The Journal of Neuroscience: The official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (7), S. 1674–1681. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3632-04.2005.
- Liu, LiPing; Hua, Zhen; Shen, Jun; Yin, Yan; Yang, Jing; Cheng, Kathleen et al. (2017): Comparative Efficacy of Multiple Variables of Mesenchymal Stem Cell Transplantation for the Treatment of Neuropathic Pain in Rats. In: *Military Medicine* 182 (S1), S. 175–184. DOI: 10.7205/MILMED-D-16-00096.
- Lu, Shao-Gang; Zhang, Xiulin; Gold, Michael S. (2006): Intracellular calcium regulation among subpopulations of rat dorsal root ganglion neurons. In: *The Journal of Physiology* 577 (Pt 1), S. 169–190. DOI: 10.1113/jphysiol.2006.116418.
- Luca, Alba C. de; Faroni, Alessandro; Reid, Adam J. (2015): Dorsal Root Ganglia Neurons and Differentiated Adipose-derived Stem Cells: An *In Vitro* Co-culture Model to Study Peripheral Nerve Regeneration. In: *Journal of Visualized Experiments* (96). DOI: 10.3791/52543.
- Luo, Z. D.; Calcutt, N. A.; Higuera, E. S.; Valder, C. R.; Song, Y.-H.; Svensson, C. I.; Myers, R. R. (2002): Injury Type-Specific Calcium Channel $\alpha 2\delta -1$ Subunit Up-Regulation in Rat Neuropathic Pain Models Correlates with Antiallodynic Effects of Gabapentin. In: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 303 (3), S. 1199–1205. DOI: 10.1124/jpet.102.041574.
- Luo, Z. David; Chaplan, Sandra R.; Higuera, Emiliano S.; Sorkin, Linda S.; Stauderman, Kenneth A.; Williams, Mark E.; Yaksh, Tony L. (2001): Upregulation of Dorsal Root Ganglion $\alpha 2\delta$ Calcium Channel Subunit and Its Correlation with Allodynia in Spinal Nerve-Injured Rats. In: *The Journal of Neuroscience* 21, S. 1868–1875.
- Ma, Weiya; St-Jacques, Bruno; Duarte, Pedro Cruz (2012): Targeting pain mediators induced by injured nerve-derived COX2 and PGE2 to treat neuropathic pain. In: *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 16 (6), S. 527–540. DOI: 10.1517/14728222.2012.680955.
- Maggi, Carlo Alberto (1991): Capsaicin and primary afferent neurons: From basic science to human therapy? In: *Journal of the Autonomic Nervous System* 33 (1), S. 1–14. DOI: 10.1016/0165-1838(91)90013-S.
- Malick, Amy; Jakubowski, Moshe; Elmquist, Joel K.; Saper, Clifford B.; Burstein, Rami (2001): A neurohistochemical blueprint for pain-induced loss of appetite. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (17), S. 9930–9935.

- Malin, Sacha A.; Davis, Brian M.; Molliver, Derek C. (2007): Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. In: *Nature Protocols* 2 (1), S. 152–160. DOI: 10.1038/nprot.2006.461.
- Manderson, Anthony P.; Kay, Jason G.; Hammond, Luke A.; Brown, Darren L.; Stow, Jennifer L. (2007): Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNFalpha. In: *The Journal of Cell Biology* 178 (1), S. 57–69. DOI: 10.1083/jcb.200612131.
- Manna, Shyamshree S. S.; Umathe, Sudhir N. (2012): Involvement of transient receptor potential vanilloid type 1 channels in the pro-convulsant effect of anandamide in pentylenetetrazole-induced seizures. In: *Epilepsy Research* 100 (1-2), S. 113–124. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2012.02.003.
- Mannari, Tetsuya; Morita, Shoko; Furube, Eriko; Tominaga, Makoto; Miyata, Seiji (2013): Astrocytic TRPV1 ion channels detect blood-borne signals in the sensory circumventricular organs of adult mouse brains. In: *Glia* 61 (6), S. 957–971. DOI: 10.1002/glia.22488.
- Marsh, S. J.; Stansfeld, C. E.; Brown, D. A.; Davey, R.; McCarthy, D. (1987): The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons in vitro. In: *Neuroscience* 23 (1), S. 275–289. DOI: 10.1016/0306-4522(87)90289-2.
- Martin, D. J.; McClelland, David; Herd, M. B.; Sutton, K. G.; Hall, M. D.; Lee, K. et al. (2002): Gabapentin-mediated inhibition of voltage-activated Ca channel currents in cultured sensory neurones is dependent on culture conditions and channel subunit expression. In: *Neuropharmacology* 42, S. 353–366.
- Maruyama, Megumi; Nishi, Maiko; Konishi, Masahiro; Takashige, Yuko; Nagashima, Kei; Kiyohara, Toshikazu; Kanosue, Kazuyuki (2003): Brain regions expressing Fos during thermoregulatory behavior in rats. In: *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 285 (5), R1116-23. DOI: 10.1152/ajpregu.00166.2002.
- Marzo, Vincenzo; Starowicz, Katarzyna; Cristino, Luigia (2008): TRPV1 Receptors in the Central Nervous System: Potential for Previously Unforeseen Therapeutic Applications. In: *CPD* 14 (1), S. 42–54. DOI: 10.2174/138161208783330790.
- Matsusaka, Taiji; Fujikawa, Keiko; Nishio, Yukihiko; Mukaida, Naofumi; Matsushima, Kouji; Kishimoto, Tadimitsu; Akira, Shizuo (1993): Transcription factors NF-IL6 and NF-kappaB synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, S. 10193–10197.
- Mazher, Mohammed; Madden, Christopher J.; Burchiel, Kim J.; Morrison, Shaun F. (2018): Preoptic area cooling increases the sympathetic outflow to brown adipose tissue (BAT) and BAT thermogenesis. In: 2018 International Conference on Unmanned Aircraft Systems (ICUAS). 2018 International Conference on Unmanned Aircraft Systems (ICUAS). Dallas, TX, USA, 12.06.2018 - 15.06.2018: IEEE, S. 379–384.
- McClelland, David; Evans, Rhian M.; Barkworth, Louise; Martin, Duncan J.; Scott, Roderick H. (2004): A study comparing the actions of gabapentin and pregabalin on the electrophysiological properties of cultured DRG neurones from neonatal rats. In: *BMC Pharmacology* 4, S. 14. DOI: 10.1186/1471-2210-4-14.

- McCullough, Lynne; Arora, Sanjay (2004): Diagnosis and Treatment of Hypothermia. In: *American Family Physician* 70 (12), S. 2325–2332.
- McGaraughty, Steve; Segreti, Jason A.; Fryer, Ryan M.; Brown, Brian S.; Faltynek, Connie R.; Kym, Philip R. (2009): Antagonism of TRPV1 receptors indirectly modulates activity of thermoregulatory neurons in the medial preoptic area of rats. In: *Brain Research* 1268, S. 58–67. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.02.018.
- McGivern, Joseph G. (2007): Ziconitide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain. In: *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 3, S. 69–85.
- McKemy, David D.; Neuhausser, Werner M.; Julius, David (2002): Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. In: *Nature* 416 (6876), S. 52–58. DOI: 10.1038/nature719.
- McKinley, M. J.; McAllen, R. M.; Davern, P.; Giles, M. E.; Penschow, J.; Sunn, N. et al. (2003): The sensory circumventricular organs of the mammalian brain. In: *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology* 172, III–XII, 1–122, back cover.
- McKinley, M. J.; Yao, S. T.; Uschakov, A.; McAllen, R. M.; Rundgren, M.; Martelli, D. (2015): The median preoptic nucleus: front and centre for the regulation of body fluid, sodium, temperature, sleep and cardiovascular homeostasis. In: *Acta Physiologica* 214 (1), S. 8–32. DOI: 10.1111/apha.12487.
- Miller, Richard J.; Jung, Hosung; Bhangoo, Sonia K.; White, Fletcher A. (2009): Cytokine and chemokine regulation of sensory neuron function. In: *Handbook of Experimental Pharmacology* (194), S. 417–449. DOI: 10.1007/978-3-540-79090-7_12.
- Milligan, Erin D.; Sloane, Evan M.; Langer, Stephen J.; Hughes, Travis S.; Jekich, Brian M.; Frank, Matthew G. et al. (2006): Repeated intrathecal injections of plasmid DNA encoding interleukin-10 produce prolonged reversal of neuropathic pain. In: *Pain* 126 (1–3), S. 294–308. DOI: 10.1016/j.pain.2006.07.009.
- Mitterreiter, Johanna G.; Ouwendijk, Werner J. D.; van Velzen, Monique; van Nierop, Gijsbert P.; Osterhaus, Albert D. M. E.; Verjans, Georges M. G. M. (2017): Satellite glial cells in human trigeminal ganglia have a broad expression of functional Toll-like receptors. In: *European Journal of Immunology* 47 (7), S. 1181–1187. DOI: 10.1002/eji.201746989.
- Mizumura, Kazue (1997): Peripheral mechanism of hyperalgesia - sensitization of nociceptors. In: *Journal of Medical Sciences* 60, S. 69–87.
- Mizumura, Kazue; Koda, Hisashi; Kumazawa, Takao (2000): Possible contribution of protein kinase C in the effects of histamine on the visceral nociceptor activities in vitro. In: *Neuroscience Research* 37 (3), S. 183–190. DOI: 10.1016/S0168-0102(00)00116-4.
- Moon, Tae Chul; Befus, A. Dean; Kulka, Marianna (2014): Mast cell mediators: their differential release and the secretory pathways involved. In: *Frontiers in Immunology* 5, S. 569. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00569.
- Moriyama, Tomoko; Higashi, Tomohiro; Togashi, Kazuya; Iida, Tohko; Segi, Eri; Sugimoto, Yukihiko et al. (2005): Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. In: *Molecular Pain* 1, S. 3. DOI: 10.1186/1744-8069-1-3.
- Moriyama, Tomoko; Iida, Tohko; Kobayashi, Kimiko; Higashi, Tomohiro; Fukuoka, Tetsuo; Tsumura, Hideki et al. (2003): Possible Involvement of P2Y₂ Metabotropic Receptors in ATP-Induced Transient Receptor Potential Vanilloid Receptor 1-Mediated

- Thermal Hypersensitivity. In: *The Journal of Neuroscience* 23 (14), S. 6058–6062. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-14-06058.2003.
- Morrison, S. F.; Nakamura, K. (2018): Central Mechanisms for Thermoregulation. In: *Annual Review of Physiology*. DOI: 10.1146/annurev-physiol-020518-114546.
- Morrison, Shaun F.; Madden, Christopher J.; Tupone, Domenico (2012): Central control of brown adipose tissue thermogenesis. In: *Frontiers in Endocrinology* 3 (5). DOI: 10.3389/fendo.2012.00005.
- Morrison, Shaun F.; Nakamura, Kazuhiro (2011): Central neural pathways for thermoregulation. In: *Frontiers in Bioscience* 16, S. 74–104.
- Morrison, Shaun F.; Nakamura, Kazuhiro; Madden, Christopher J. (2008): Central control of thermogenesis in mammals. In: *Experimental Physiology* 93 (7), S. 773–797. DOI: 10.1113/expphysiol.2007.041848.
- Mueller, Marcus; Wacker, Karin; Ringelstein, E. Bernd; Hickey, William F.; Imai, Yoshinori; Kiefer, Reinhard (2001): Rapid Response of Identified Resident Endoneurial Macrophages to Nerve Injury. In: *The American Journal of Pathology* 159 (6), S. 2187–2197. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63070-2.
- Muraki, Katsuhiko; Iwata, Yuko; Katanosaka, Yuki; Ito, Tomohiro; Ohya, Susumu; Shigekawa, Munekazu; Imaizumi, Yuji (2003): TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. In: *Circulation Research* 93 (9), S. 829–838. DOI: 10.1161/01.RES.0000097263.10220.0C.
- Murphy, P. G.; Grondin, J.; Altares, M.; Richardson, P. M. (1995): Induction of Interleukin-6 in Axotomized Sensory Neurons. In: *The Journal of Neuroscience* (15), S. 5130–5138.
- Myers, Robert R.; Campana, W. Marie; Shubayev, Veronica I. (2006): The role of neuroinflammation in neuropathic pain: mechanisms and therapeutic targets. In: *Drug Discovery Today* 11 (1-2), S. 8–20. DOI: 10.1016/S1359-6446(05)03637-8.
- Nagy, I.; Rang, H. (1999): Noxious heat activates all capsaicin-sensitive and also a sub-population of capsaicin-insensitive dorsal root ganglion neurons. In: *Neuroscience* 88 (4), S. 995–997.
- Nakamura, Kazuhiro; Morrison, Shaun F. (2008a): A thermosensory pathway that controls body temperature. In: *Nature neuroscience* (11), S. 62–71.
- Nakamura, Kazuhiro; Morrison, Shaun F. (2008b): Preoptic mechanism for cold-defensive responses to skin cooling. In: *The Journal of Physiology* 586 (10), S. 2611–2620. DOI: 10.1113/jphysiol.2008.152686.
- Nakamura, Kazuhiro; Morrison, Shaun F. (2010): A thermosensory pathway mediating heat-defense responses. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (19), S. 8848–8853. DOI: 10.1073/pnas.0913358107.
- Nakamura, Kazuhiro; Morrison, Shaun F. (2011): Central efferent pathways for cold-defensive and febrile shivering. In: *The Journal of Physiology* 589 (Pt 14), S. 3641–3658. DOI: 10.1113/jphysiol.2011.210047.
- Newton, Richard A.; Bingham, Sharon; Case, Patrick C.; Sanger, Gareth J.; Lawson, Sally N. (2001): Dorsal root ganglion neurons show increased expression of the calcium channel $\alpha 2\delta$ -1 subunit following partial sciatic nerve injury. In: *Molecular Brain Research* 95 (1-2), S. 1–8. DOI: 10.1016/S0169-328X(01)00188-7.

- Nicol, Grant D.; Klingberg, D. K.; Vasko, M. R. (1992): Prostaglandin E2 Increases Calcium Conductance and Stimulates Release of Substance P in Avian Sensory Neurons. In: *The Journal of Neuroscience* 12 (5), S. 1917–1927.
- Nozadze, Ivliane; Tsiklauri, Nana; Gurtskaia, Gulnaz; Tsagareli, Merab G. (2016): NSAIDs attenuate hyperalgesia induced by TRP channel activation. In: *Data in brief* 6, S. 668–673. DOI: 10.1016/j.dib.2015.12.055.
- Obreja, O.; Biasio, W.; Andratsch, M.; Lips, K. S.; Rathee, P. K.; Ludwig, A. et al. (2005): Fast modulation of heat-activated ionic current by proinflammatory interleukin 6 in rat sensory neurons. In: *Brain: A Journal of Neurology* 128 (Pt 7), S. 1634–1641. DOI: 10.1093/brain/awh490.
- Obreja, Otilia; Rathee, Parvinder K.; Lips, Kathrin S.; Distler, Carsten; Kress, Michaela (2002a): IL-1 beta potentiates heat-activated currents in rat sensory neurons: involvement of IL-1RI, tyrosine kinase, and protein kinase C. In: *FASEB journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (12), S. 1497–1503. DOI: 10.1096/fj.02-0101com.
- Obreja, Otilia; Schmelz, Martin; Poole, Stephen; Kress, Michaela (2002b): Interleukin-6 in combination with its soluble IL-6 receptor sensitises rat skin nociceptors to heat, in vivo. In: *Pain* 96 (1), S. 57–62. DOI: 10.1016/S0304-3959(01)00420-1.
- Oh, Seog Bae; Tran, Phuong B.; Gillard, Samantha E.; Hurley, Robert W.; Hammond, Donna L.; Miller, Richard J. (2001): Chemokines and Glycoprotein120 Produce Pain Hypersensitivity by Directly Exciting Primary Nociceptive Neurons. In: *The Journal of Neuroscience* 21 (14), S. 5027–5035. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-14-05027.2001.
- Ohara, Peter T.; Vit, Jean-Philippe; Bhargava, Aditi; Romero, Marcela; Sundberg, Christopher; Charles, Andrew C.; Jasmin, Luc (2009): Gliopathic pain: when satellite glial cells go bad. In: *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 15 (5), S. 450–463. DOI: 10.1177/1073858409336094.
- Okazawa, M.; Terauchi, T.; Shiraki, T.; Matsumura, K.; Kobayashi, S. (2000): 1-Menthyl-induced Ca²⁺i increase and impulses in cultured sensory neurons. In: *Neuroreport* 11 (10), S. 2151–2155.
- Okazawa, Makoto; Inoue, Wataru; Hori, Aiko; Hosokawa, Hiroshi; Matsumura, Kiyoshi; Kobayashi, Shigeo (2004): Noxious heat receptors present in cold-sensory cells in rats. In: *Neuroscience Letters* 359 (1-2), S. 33–36. DOI: 10.1016/j.neulet.2004.01.074.
- Ossipov, Michael H.; Dussor, Gregory O.; Porreca, Frank (2010): Central modulation of pain. In: *The Journal of Clinical Investigation* 120 (11), S. 3779–3787. DOI: 10.1172/JCI43766.
- Ott, Daniela; Murgott, Jolanta; Rafalzik, Sandra; Wuchert, Florian; Schmalenbeck, Babette; Roth, Joachim; Gerstberger, Rüdiger (2010): Neurons and glial cells of the rat organum vasculosum laminae terminalis directly respond to lipopolysaccharide and pyrogenic cytokines. In: *Brain Research* 1363, S. 93–106. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.09.083.
- Ott, Daniela; Simm, Björn; Pollatzek, Eric; Gerstberger, Rüdiger; Rummel, Christoph; Roth, Joachim (2015): Prostaglandin D2 modulates calcium signals induced by prostaglandin E2 in neurons of rat dorsal root ganglia. In: *Neuroscience Letters* 597, S. 159–163. DOI: 10.1016/j.neulet.2015.04.031.

- Palladino, Michael A.; Bahjat, Frances Rena; Theodorakis, Emmanuel A.; Moldawer, Lyle L. (2003): Anti-TNF-alpha therapies: the next generation. In: *Nature Reviews. Drug Discovery* 2 (9), S. 736–746. DOI: 10.1038/nrd1175.
- Passmore, Gayle M. (2005): Dorsal root ganglion neurones in culture: a model system for identifying novel analgesic targets? In: *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 51 (3), S. 201–208. DOI: 10.1016/j.vascn.2004.08.007.
- Pasterkamp, R. J.; Giger, R. J.; Baker, R. E.; Hermens, W. T.; Verhaagen, J. (2000): Ectopic adenoviral vector-directed expression of Sema3A in organotypic spinal cord explants inhibits growth of primary sensory afferents. In: *Developmental Biology* 220 (2), S. 129–141. DOI: 10.1006/dbio.2000.9627.
- Patapoutian, Ardem; Peier, Andrea M.; Story, Gina M.; Viswanath, Veena (2003): ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. In: *Nature reviews. Neuroscience* 4 (7), S. 529–539. DOI: 10.1038/nrn1141.
- Patapoutian, Ardem; Tate, Simon; Woolf, Clifford J. (2009): Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. In: *Nature Reviews. Drug Discovery* 8 (1), S. 55–68. DOI: 10.1038/nrd2757.
- Pehl, U.; Schmid, H. A.; Simon, E. (1997): Temperature sensitivity of neurones in slices of the rat spinal cord. In: *The Journal of Physiology* 498 (2), S. 483–495. DOI: 10.1113/jphysiol.1997.sp021874.
- Peier, Andrea M.; Moqrich, Aziz; Hergarden, Anne C.; Reeve, Alison J.; Andersson, David A.; Story, Gina M. et al. (2002): A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. In: *Cell* 108 (5), S. 705–715.
- Peterson, E. R.; Crain, S. M. (1982): Nerve Growth Factor attenuates neurotoxic effects of taxol on spinal cord-ganglion explants from fetal mice. In: *Science* 217, S. 377–379. DOI: 10.1126/science.6124041.
- Pinho-Ribeiro, Felipe A.; Verri, Waldiceu A.; Chiu, Isaac M. (2017): Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. In: *Trends in Immunology* 38 (1), S. 5–19. DOI: 10.1016/j.it.2016.10.001.
- Piper, A. S.; Yeats, J. C.; Bevan, S.; Docherty, R. J. (1999): A study of the voltage dependence of capsaicin-activated membrane currents in rat sensory neurones before and after acute desensitization. In: *The Journal of Physiology* 518 (3), S. 721–733. DOI: 10.1111/j.1469-7793.1999.0721p.x.
- Pitchford, Simon; Levine, Jon D. (1991): Prostaglandins sensitize nociceptors in cell culture. In: *Neuroscience Letters* 132 (1), S. 105–108. DOI: 10.1016/0304-3940(91)90444-X.
- Podratz, Jewel L.; Knight, Andrew M.; Ta, Lauren E.; Staff, Nathan P.; Gass, Jennifer M.; Genelin, Konstantin et al. (2011): Cisplatin induced mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. In: *Neurobiology of Disease* 41 (3), S. 661–668. DOI: 10.1016/j.nbd.2010.11.017.
- Polgár, E.; Hughes, I. D.; Riddell, S. J.; Maxwell, J. D.; Puskár, Z.; Todd, J. A. (2003): Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. In: *Pain* 104 (1), S. 229–239. DOI: 10.1016/S0304-3959(03)00011-3.

- Polgár, Erika; Wright, Lorna L.; Todd, Andrew J. (2010): A quantitative study of brainstem projections from lamina I neurons in the cervical and lumbar enlargement of the rat. In: *Brain Research* 1308, S. 58–67. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.10.041.
- Pope, R. M.; Leutz, A.; Ness, S. A. (1994): C/EBP beta regulation of the tumor necrosis factor alpha gene. In: *The Journal of Clinical Investigation* 94 (4), S. 1449–1455. DOI: 10.1172/JCI117482.
- Premkumar, Louis S.; Raisinghani, Manish; Pingle, Sandeep C.; Long, Cheng; Pimentel, Fátima (2005): Downregulation of transient receptor potential melastatin 8 by protein kinase C-mediated dephosphorylation. In: *The Journal of Neuroscience: The official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (49), S. 11322–11329. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3006-05.2005.
- Prescott, Elizabeth D.; Julius, David (2003): A modular PIP2 Binding Site as a Determinant of Capsaicin Receptor Sensitivity. In: *Science* 300 (5623), S. 1280–1284. DOI: 10.1126/science.1082393.
- Puntambekar, Preeti; Mukherjee, Debashree; Jajoo, Sarvesh; Ramkumar, Vickram (2005): Essential role of Rac1/NADPH oxidase in nerve growth factor induction of TRPV1 expression. In: *Journal of Neurochemistry* 95 (6), S. 1689–1703. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2005.03518.x.
- Raghavendra, Vasudeva; Tanga, Flobert; DeLeo, Joyce A. (2003): Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 306 (2), S. 624–630. DOI: 10.1124/jpet.103.052407.
- Rahman, Wahida; Sikandar, Shafaq; Sikander, Shafaq; Suzuki, Rie; Hunt, Stephen P.; Dickenson, Anthony H. (2007): Superficial NK1 expressing spinal dorsal horn neurones modulate inhibitory neurotransmission mediated by spinal GABA(A) receptors. In: *Neuroscience Letters* 419 (3), S. 278–283. DOI: 10.1016/j.neulet.2007.04.039.
- Rathner, J. A.; Owens, N. C.; McAllen, R. M. (2001): Cold-activated raphé-spinal neurons in rats. In: *The Journal of Physiology* 535 (3), S. 841–854. DOI: 10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00841.x.
- Reid, Gordon; Babes, Alexandru; Pluteanu, Florentina (2002): A cold- and menthol-activated current in rat dorsal root ganglion neurones: properties and role in cold transduction. In: *The Journal of Physiology* 545 (Pt 2), S. 595–614.
- Riera, Céline E.; Huising, Mark O.; Follett, Patricia; Leblanc, Mathias; Halloran, Jonathan; van Andel, Roger et al. (2014): TRPV1 pain receptors regulate longevity and metabolism by neuropeptide signaling. In: *Cell* 157 (5), S. 1023–1036. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.051.
- Rizvi, Tilat A.; Murphy, Anne Z.; Ennis, Matthew; Behbehani, Michael M.; Shipley, Michael T. (1996): Medial Preoptic Area Afferents to Periaqueductal Gray Medullo-Output Neurons: A Combined Fos and Tract Tracing Study. In: *The Journal of Neuroscience* 16, S. 333–344.
- Roberts, Jennifer C.; Davis, John B.; Benham, Christopher D. (2004): [3H]Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. In: *Brain Research* 995 (2), S. 176–183. DOI: 10.1016/j.brainres.2003.10.001.

- Roberts, Louise A.; Connor, Mark (2006): TRPV1 Antagonists as a Potential Treatment for Hyperalgesia. In: *Recent Patents on CNS Drug Discovery* 1, S. 65–76.
- Romanovsky, Andrej A.; Almeida, Maria C.; Garami, Andras; Steiner, Alexandre A.; Norman, Mark H.; Morrison, Shaun F. et al. (2009): The Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Channel in Thermoregulation: A Thermosensor It Is Not. In: *Pharmacological Reviews* 61 (3), S. 228–261. DOI: 10.1124/pr.109.001263.
- Ross, Günter; Roth, Joachim; Störr, Birgit; Voigt, Karlheinz; Zeisberger, Eugen (2000): Afferent nerves are involved in the febrile response to injection of LPS into artificial subcutaneous chambers in guinea pigs. In: *Physiology & Behavior* 71, S. 305–313.
- Roth, Joachim; Blatteis, Clark M. (2014): Mechanisms of fever production and lysis: lessons from experimental LPS fever. In: *Comprehensive Physiology* 4 (4), S. 1563–1604. DOI: 10.1002/cphy.c130033.
- Roth, Joachim; Rummel, Christoph; Barth, Stephan W.; Gerstberger, Rüdiger; Hübschle, Thomas (2009): Molecular aspects of fever and hyperthermia. In: *Immunology and Allergy Clinics of North America* 29 (2), S. 229–245. DOI: 10.1016/j.iac.2009.02.005.
- Rozas, Pablo; Lazcano, Pablo; Piña, Ricardo; Cho, Andrew; Terse, Anita; Pertusa, Maria et al. (2016): Targeted overexpression of tumor necrosis factor- α increases cyclin-dependent kinase 5 activity and TRPV1-dependent Ca²⁺ influx in trigeminal neurons. In: *Pain* 157 (6), S. 1346–1362. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000000527.
- Rummel, Christoph (2016): Inflammatory transcription factors as activation markers and functional readouts in immune-to-brain communication. In: *Brain, Behavior, and Immunity* 54, S. 1–14. DOI: 10.1016/j.bbi.2015.09.003.
- Samad, Tarek; Abdi, Salahadin (2001): Cyclooxygenase-2 and antagonists in pain management. In: *Current Opinion in Anaesthesiology* 14, S. 527–532.
- Sanchez, J.F.; Krause, J.E.; Cortright, D.N (2001): The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat. In: *Neuroscience* 107 (3), S. 373–381. DOI: 10.1016/S0306-4522(01)00373-6.
- Saper, Clifford B.; Romanovsky, Andrej A.; Scammell, Thomas E. (2012): Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. In: *Nature Neuroscience* 15 (8), S. 1088–1095. DOI: 10.1038/nn.3159.
- Sarantopoulos, C.; McCallum, B.; Kwok, W.-M.; Hogan, Q. (2002): Gabapentin decreases membrane calcium currents in injured as well as in control mammalian primary afferent neurons. In: *Regional Anesthesia and Pain Medicine* 27 (1), S. 47–57. DOI: 10.1053/rapm.2002.29124.
- Sarmiento, Carlos; Rodrigues, Marcio; Bocabello, Renato; Mess, Andrea; Miglino, Maria (2014): Pilot study: bone marrow stem cells as a treatment for dogs with chronic spinal cord injury. In: *Regenerative Medicine Research* 2 (1), S. 9. DOI: 10.1186/2050-490X-2-9.
- Sasamura, Takashi; Sasaki, Miwa; Tohda, Chihito; Kuraishi, Yasushi (1998): Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. In: *Neuroreport* 9 (9), S. 2045–2048. DOI: 10.1097/00001756-199806220-00025.
- Savidge, J.R.; Ranasinghe, S.P.; Rang, H.P (2001): Comparison of intracellular calcium signals evoked by heat and capsaicin in cultured rat dorsal root ganglion neurons and in

- a cell line expressing the rat vanilloid receptor, VR1. In: *Neuroscience* 102 (1), S. 177–184. DOI: 10.1016/S0306-4522(00)00447-4.
- Scammell, T. E.; Price, K. J.; Sagar, S. M. (1993): Hyperthermia induces c-fos expression in the preoptic area. In: *Brain Research* 618 (2), S. 303–307. DOI: 10.1016/0006-8993(93)91280-6.
- Schäfer, K.; Braun, H. A.; Isenberg, C. (1986): Effect of menthol on cold receptor activity. In: *Journal of General Physiology* (88), S. 757–776.
- Schäfers, Maria; Sommer, Claudia (2007): Anticytokine therapy in neuropathic pain management. In: *Expert Review of Neurotherapeutics* 7 (11), S. 1613–1627. DOI: 10.1586/14737175.7.11.1613.
- Schäfers, Maria; Svensson, Camilla I.; Sommer, Claudia; Sorkin, Linda S. (2003): Tumor Necrosis Factor- α Induces Mechanical Allodynia after Spinal Nerve Ligation by Activation of p38 MAPK in Primary Sensory Neurons. In: *The Journal of Neuroscience* 23 (7), S. 2517–2521. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-07-02517.2003.
- Schaible, Hans-Georg (2015): Pain control. In: *Handbook of Experimental Pharmacology* 227.
- Schneider, Tobias; Ruppen, Wilhelm (2017): Opiate – Fluch oder Segen? – Eine aktuelle Übersicht. In: *Therapeutische Umschau. Revue Therapeutique* 74 (5), S. 277–283. DOI: 10.1024/0040-5930/a000915.
- Schneiders, Jenny; Fuchs, Franziska; Damm, Jelena; Herden, Christiane; Gerstberger, Rüdiger; Soares, Denis Melo et al. (2015): The transcription factor nuclear factor interleukin 6 mediates pro- and anti-inflammatory responses during LPS-induced systemic inflammation in mice. In: *Brain, Behavior, and Immunity* 48, S. 147–164. DOI: 10.1016/j.bbi.2015.03.008.
- Sculptoreanu, A.; Kullmann, F. A.; Artim, D. E.; Bazley, F. A.; Schopfer, F.; Woodcock, S. et al. (2010): Nitro-oleic acid inhibits firing and activates TRPV1- and TRPA1-mediated inward currents in dorsal root ganglion neurons from adult male rats. In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 333 (3), S. 883–895. DOI: 10.1124/jpet.109.163154.
- Sharif-Naeini, Reza; Ciura, Sorana; Bourque, Charles W. (2008): TRPV1 gene required for thermosensory transduction and anticipatory secretion from vasopressin neurons during hyperthermia. In: *Neuron* 58 (2), S. 179–185. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.02.013.
- Shibasaki, Koji (2016): TRPV4 ion channel as important cell sensors. In: *Journal of Anesthesia* 30 (6), S. 1014–1019. DOI: 10.1007/s00540-016-2225-y.
- Shibasaki, Koji; Ikenaka, Kazuhiro; Tamalu, Fuminobu; Tominaga, Makoto; Ishizaki, Yasuki (2014): A novel subtype of astrocytes expressing TRPV4 (transient receptor potential vanilloid 4) regulates neuronal excitability via release of gliotransmitters. In: *The Journal of Biological Chemistry* 289 (21), S. 14470–14480. DOI: 10.1074/jbc.M114.557132.
- Shibasaki, Koji; Ishizaki, Yasuki; Mandadi, Sravan (2013): Astrocytes express functional TRPV2 ion channels. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 441 (2), S. 327–332. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.046.
- Shirazi, Mohsen; Izadi, Mahin; Amin, Masoud; Rezvani, Mohammad Ebrahim; Roohbakhsh, Ali; Shamsizadeh, Ali (2014): Involvement of central TRPV1 receptors in

- pentylentetrazole and amygdala-induced kindling in male rats. In: *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 35 (8), S. 1235–1241. DOI: 10.1007/s10072-014-1689-5.
- Siemens, Jan; Kamm, Gretel B. (2018): Cellular populations and thermosensing mechanisms of the hypothalamic thermoregulatory center. In: *European Journal of Physiology* 470 (5), S. 809–822. DOI: 10.1007/s00424-017-2101-0.
- Simm, B.; Ott, D.; Pollatzek, E.; Murgott, J.; Gerstberger, R.; Rummel, C.; Roth, J. (2016): Effects of prostaglandin E2 on cells cultured from the rat organum vasculosum laminae terminalis and median preoptic nucleus. In: *Neuroscience* 313, S. 23–35. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.11.034.
- Simon, E.; Iriki, M. (1970): Ascending Neurons of the Spinal Cord Activated by Cold. In: *Experientia* 26, S. 620–622.
- Simon, E.; Iriki, M. (1971): Sensory transmission of spinal heat and cold sensitivity in ascending spinal neurons. In: *Pflügers Archive* 328 (2), S. 103–120. DOI: 10.1007/BF00592439.
- Smith, Jacqueline A. M.; Davis, Clare L.; Burgess, Gillian M. (2000): Prostaglandin E 2 -induced sensitization of bradykinin-evoked responses in rat dorsal root ganglion neurons is mediated by cAMP-dependent protein kinase A. In: *European Journal of Neuroscience* 12 (9), S. 3250–3258. DOI: 10.1046/j.1460-9568.2000.00218.x.
- Soares, Denis de Melo; Santos, Danielle R.; Rummel, Christoph; Ott, Daniela; Melo, Míriam C. C.; Roth, Joachim et al. (2017): The relevance of kalikrein-kinin system via activation of B2 receptor in LPS-induced fever in rats. In: *Neuropharmacology* 126, S. 84–96. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.08.019.
- Sommer, Claudia; Schmidt, Christine; George, Annette (1998): Hyperalgesia in Experimental Neuropathy Is Dependent on the TNF Receptor 1. In: *Experimental Neurology* 151 (1), S. 138–142. DOI: 10.1006/exnr.1998.6797.
- Song, Kun; Wang, Hong; Kamm, Gretel B.; Pohle, Jörg; Reis, Fernanda de Castro; Heppenstall, Paul et al. (2016): The TRPM2 channel is a hypothalamic heat sensor that limits fever and can drive hypothermia. In: *Science* 353 (6306), S. 1393–1398. DOI: 10.1126/science.aaf7537.
- Spike, R. C.; Puskar, Z.; Andrew, D.; Todd, A. J. (2003): A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord. In: *The European Journal of Neuroscience* 18 (9), S. 2433–2448. DOI: 10.1046/j.1460-9568.2003.02981.x.
- Steenland, Hendrik W.; Ko, Shanelle W.; Wu, Long-Jun; Zhuo, Min (2006): Hot receptors in the brain. In: *Molecular Pain* 2, S. 34. DOI: 10.1186/1744-8069-2-34.
- Stein, Alexander T.; Ufret-Vincenty, Carmen A.; Hua, Li; Santana, Luis F.; Gordon, Sharon E. (2006): Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. In: *The Journal of General Physiology* 128 (5), S. 509–522. DOI: 10.1085/jgp.200609576.
- Sugimoto, Tomosada; Takeyama, Akihiro; Fujita, Masako; Ichikawa, Hiroyuki; Takano-Yamamoto, Teruko (2000): Peripheral neuroglial death induced by cisplatin administration in newborn rats. In: *Neuroreport* 12 (1), S. 137–140.

- Sugiura, Takeshi; Tominaga, Makoto; Katsuya, Hirotada; Mizumura, Kazue (2002): Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. In: *Journal of Neurophysiology* 88 (1), S. 544–548. DOI: 10.1152/jn.2002.88.1.544.
- Suto, K.; Gotoh, H. (1999): Calcium signaling in cold cells studied in cultured dorsal root ganglion neurons. In: *Neuroscience* 92 (3), S. 1131–1135. DOI: 10.1016/S0306-4522(99)00063-9.
- Sutton, K. G.; Martin, D. J.; Pinnock, R. D.; Lee, K.; Scott, R. H. (2002): Gabapentin inhibits high-threshold calcium channel currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones. In: *British Journal of Pharmacology* 135 (1), S. 257–265. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704439.
- Sutton, K. S.; Chung, F.-Z.; Pinnock, R. D.; Lee, K.; Maneuf, Y. P.; Gonzalez, M. I. (2003): Cellular and molecular action of the putative GABA-mimetic, gabapentin. In: *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 60 (4), S. 742–750. DOI: 10.1007/s00018-003-2108-x.
- Svensson, Camilla I.; Marsala, Martin; Westerlund, Anna; Calcutt, Nigel A.; Campana, Wendy M.; Freshwater, Jason D. et al. (2003): Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia is a critical link in inflammation-induced spinal pain processing. In: *Journal of Neurochemistry* 86 (6), S. 1534–1544. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2003.01969.x.
- Szallasi, Arpad; Blumberg, Peter M. (1990a): Resiniferatoxin and its analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (capsaicin) receptor. In: *Life Sciences* 47 (16), S. 1399–1408. DOI: 10.1016/0024-3205(90)90518-V.
- Szallasi, Arpad; Blumberg, Peter M. (1990b): Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes. In: *Brain Research* 524 (1), S. 106–111. DOI: 10.1016/0006-8993(90)90498-Z.
- Szallasi, Arpad; Blumberg, Peter M. (1999): Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms. In: *Pharmacological Reviews* (51), S. 160–211.
- Szelényi, Z.; Hummel, Z.; Szolcsányi, J.; Davis, J. B. (2004): Daily body temperature rhythm and heat tolerance in TRPV1 knockout and capsaicin pretreated mice. In: *The European Journal of Neuroscience* 19 (5), S. 1421–1424. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2004.03221.x.
- Szolcsányi, János (2015): Effect of capsaicin on thermoregulation: an update with new aspects. In: *Temperature (Austin, Tex.)* 2 (2), S. 277–296. DOI: 10.1080/23328940.2015.1048928.
- Tajino, Koji; Matsumura, Kiyoshi; Kosada, Kaori; Shibakusa, Tetsuro; Inoue, Kazuo; Fushiki, Tohru et al. (2007): Application of menthol to the skin of whole trunk in mice induces autonomic and behavioral heat-gain responses. In: *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 293 (5), R2128–35. DOI: 10.1152/ajpregu.00377.2007.
- Takahashi, Naoto; Kikuchi, Shinichi; Shubayev, Veronica I.; Campana, W. Marie; Myers, Robert R. (2006): TNF-alpha and phosphorylation of ERK in DRG and spinal cord: insights into mechanisms of sciatica. In: *Spine* 31 (5), S. 523–529. DOI: 10.1097/01.brs.0000201305.01522.17.
- Tamaddonfard, Esmaeel; Farshid, Amir-Abbas; Eghdami, Karim; Samadi, Farzad; Erfanparast, Amir (2013): Comparison of the effects of crocin, safranal and diclofenac

on local inflammation and inflammatory pain responses induced by carrageenan in rats. In: *Pharmacological Reports* 65, S. 1272–1280.

Tan, Chun-Hsiang; McNaughton, Peter A. (2016): The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth. In: *Nature* 536 (7617), S. 460–463. DOI: 10.1038/nature19074.

Tanaka, Mutsumi; McKinley, Michael J.; McAllen, Robin M. (2011): Preoptic-raphé connections for thermoregulatory vasomotor control. In: *The Journal of Neuroscience: The official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (13), S. 5078–5088. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6433-10.2011.

Tanaka, Mutsumi; McKinley, Michael J.; McAllen, Robin M. (2013): Role of an excitatory preoptic-raphé pathway in febrile vasoconstriction of the rat's tail. In: *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 305 (12), R1479–89. DOI: 10.1152/ajpregu.00401.2013.

Todd, A. J.; Spike, R. C. (1993): The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I–III of the mammalian spinal dorsal horn. In: *Progress in Neurobiology* 41 (5), S. 609–645. DOI: 10.1016/0301-0082(93)90045-T.

Todd, Andrew J. (2010): Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. In: *Nature reviews. Neuroscience* 11 (12), S. 823–836. DOI: 10.1038/nrn2947.

Tominaga, M.; Wada, M.; Masu, M. (2001): Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (12), S. 6951–6956. DOI: 10.1073/pnas.111025298.

Tominaga, Makoto; Caterina, Michael J.; Malmberg, Annika B.; Rosen, Tobias A.; Gilbert, Heather; Skinner, Kate et al. (1998): The Cloned Capsaicin Receptor Integrates Multiple Pain-Producing Stimuli. In: *Neuron* 21 (3), S. 531–543. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80564-4.

Tominaga, Makoto; Tominaga, Tomoko (2005): Structure and function of TRPV1. In: *European Journal of Physiology* 451 (1), S. 143–150. DOI: 10.1007/s00424-005-1457-8.

Tóth, Attila; Boczán, Judit; Kedei, Noémi; Lizanecz, Erzsébet; Bagi, Zsolt; Papp, Zoltán et al. (2005): Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. In: *Brain Research. Molecular Brain Research* 135 (1–2), S. 162–168. DOI: 10.1016/j.molbrainres.2004.12.003.

Travis, K. A.; Johnson, A. K. (1993): In vitro sensitivity of median preoptic neurons to angiotensin II, osmotic pressure, and temperature. In: *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 33, R1200–R1205.

Uschakov, A.; Gong, H.; McGinty, D.; Szymusiak, R. (2007): Efferent projections from the median preoptic nucleus to sleep- and arousal-regulatory nuclei in the rat brain. In: *Neuroscience* 150 (1), S. 104–120. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2007.05.055.

Utreras, Elias; Futatsugi, Akira; Rudrabhatla, Parvathi; Keller, Jason; Iadarola, Michael J.; Pant, Harish C.; Kulkarni, Ashok B. (2009): Tumor necrosis factor- α regulates cyclin-dependent kinase 5 activity during pain signaling through transcriptional activation of p35. In: *The Journal of Biological Chemistry* 284 (4), S. 2275–2284. DOI: 10.1074/jbc.M805052200.

- Vanegas, Horacio; Schaible, Hans-Georg (2000): Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia. In: *Pain* 85 (1), S. 9–18. DOI: 10.1016/S0304-3959(99)00241-9.
- Vega-Avelaira, D.; Ballesteros, J. J.; López-García, J. A. (2013): Inflammation-induced hyperalgesia and spinal microglia reactivity in neonatal rats. In: *European Journal of Pain* 17 (8), S. 1180–1188. DOI: 10.1002/j.1532-2149.2013.00308.x.
- Vellani, Vittorio; Mapplebeck, Sarah; Moriondo, Andrea; Davis, John B.; McNaughton, Peter A. (2001): Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. In: *The Journal of Physiology* 534 (3), S. 813–825. DOI: 10.1111/j.1469-7793.2001.00813.x.
- Vizin, R. C. L.; Scarpellini, C. da S.; Ishikawa, D. T.; Correa, G. M.; Souza, C. O. de; Gargaglioni, L. H. et al. (2015): TRPV4 activates autonomic and behavioural warmth-defence responses in Wistar rats. In: *Acta Physiologica* 214 (2), S. 275–289. DOI: 10.1111/apha.12477.
- Voets, Thomas; Droogmans, Guy; Wissenbach, Ulrich; Janssens, Annelies; Flockerzi, Veit; Nilius, Bernd (2004): The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. In: *Nature* (430), S. 748–754.
- von Engelhardt, Wolfgang (2015): Physiologie der Haustiere. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Hg. v. Wolfgang von Engelhardt, Gerhard Breves, Martin Diener und Gotthold Gäbel. Stuttgart: Enke Verlag.
- Vriens, Joris; Owsianik, Grzegorz; Hofmann, Thomas; Philipp, Stephan E.; Stab, Julia; Chen, Xiaodi et al. (2011): TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. In: *Neuron* 70 (3), S. 482–494. DOI: 10.1016/j.neuron.2011.02.051.
- Wadachi, R.; Hargreaves, K. M. (2006): Trigeminal nociceptors express TLR-4 and CD14: a mechanism for pain due to infection. In: *Journal of Dental Research* 85 (1), S. 49–53. DOI: 10.1177/154405910608500108.
- Wagner, R.; Myers, R. R. (1996): Schwann cells produce tumor necrosis factor alpha: expression in injured and non-injured nerves. In: *Neuroscience* 73 (3), S. 625–629. DOI: 10.1016/0306-4522(96)00127-3.
- Wang, Hong; Siemens, Jan (2015): TRP ion channels in thermosensation, thermoregulation and metabolism. In: *Temperature* 2 (2), S. 178–187. DOI: 10.1080/23328940.2015.1040604.
- Wang, Jing; Jackson, Michael F.; Xie, Yu-Feng (2016): Glia and TRPM2 Channels in Plasticity of Central Nervous System and Alzheimer's Diseases. In: *Neural Plasticity* 2016, S. 1680905. DOI: 10.1155/2016/1680905.
- Wang, Sen; Joseph, John; Ro, Jin Y.; Chung, Man-Kyo (2015): Modality-specific mechanisms of protein kinase C-induced hypersensitivity of TRPV1: S800 is a polymodal sensitization site. In: *Pain* 156 (5), S. 931–941. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000000134.
- Watanabe, Shuji; Uchida, Kenzo; Nakajima, Hideaki; Matsuo, Hideaki; Sugita, Daisuke; Yoshida, Ai et al. (2015): Early transplantation of mesenchymal stem cells after spinal cord injury relieves pain hypersensitivity through suppression of pain-related signaling cascades and reduced inflammatory cell recruitment. In: *Stem Cells* 33 (6), S. 1902–1914. DOI: 10.1002/stem.2006.

- Watkins, Linda R.; Maier, Steven F. (2003): Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. In: *Nature Reviews. Drug Discovery* 2 (12), S. 973–985. DOI: 10.1038/nrd1251.
- White, Fletcher A.; Jung, Hosung; Miller, Richard J. (2007): Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (51), S. 20151–20158. DOI: 10.1073/pnas.0709250104.
- Willis, W. D. (2001): Role of neurotransmitters in sensitization of pain responses. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 933, S. 142–156.
- Wodarski, Rachel; Clark, Anna K.; Grist, John; Marchand, Fabien; Malcangio, Marzia (2009): Gabapentin reverses microglial activation in the spinal cord of streptozotocin-induced diabetic rats. In: *European Journal of Pain* 13 (8), S. 807–811. DOI: 10.1016/j.ejpain.2008.09.010.
- Woolf, C. J.; Costigan, M. (1999): Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (14), S. 7723–7730. DOI: 10.1073/pnas.96.14.7723.
- Woolf, C. J.; Safieh-Garabedian, B.; Ma, Q.-P.; Crilly, P.; Winter, J. (1994): Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. In: *Neuroscience* 62 (2), S. 327–331. DOI: 10.1016/0306-4522(94)90366-2.
- Woolf, Clifford J.; Mannion, Richard J. (1999): Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. In: *The Lancet* 353 (9168), S. 1959–1964. DOI: 10.1016/S0140-6736(99)01307-0.
- Wright, Helen L.; Moots, Robert J.; Bucknall, Roger C.; Edwards, Steven W. (2010): Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. In: *Rheumatology* 49 (9), S. 1618–1631. DOI: 10.1093/rheumatology/keq045.
- Wuchert, Florian; Ott, Daniala; Murgott, Jolanta; Rafalzik, Sandra; Hitzel, Norma; Roth, Joachim; Gerstberger, Rüdiger (2008): Rat area postrema microglial cells act as sensors for the toll-like receptor-4 agonist lipopolysaccharide. In: *Journal of Neuroimmunology* 204 (1-2), S. 66–74. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2008.07.017.
- Xu, X. J.; Hao, J. X.; Andell-Jonsson, S.; Poli, V.; Bartfai, T.; Wiesenfeld-Hallin, Z. (1997): Nociceptive responses in interleukin-6-deficient mice to peripheral inflammation and peripheral nerve section. In: *Cytokine* 9 (12), S. 1028–1033. DOI: 10.1006/cyto.1997.0243.
- Xue, Yawen; Yang, Yonglu; Tang, Yu; Ye, Mengping; Xu, Jianhui; Zeng, Yixin; Zhang, Jie (2016): In vitro thermosensitivity of rat lateral parabrachial neurons. In: *Neuroscience Letters* 619, S. 15–20. DOI: 10.1016/j.neulet.2016.02.058.
- Yahiro, Takaki; Kataoka, Naoya; Nakamura, Yoshiko; Nakamura, Kazuhiro (2017): The lateral parabrachial nucleus, but not the thalamus, mediates thermosensory pathways for behavioural thermoregulation. In: *Scientific Reports* 7 (1), S. 5031. DOI: 10.1038/s41598-017-05327-8.
- Yamaguchi, Keisuke; Kumakura, Seiichiro; Someya, Akimasa; Iseki, Masako; Inada, Eiichi; Nagaoka, Isao (2017): Anti-inflammatory actions of gabapentin and pregabalin on the substance P-induced mitogen-activated protein kinase activation in U373 MG human glioblastoma astrocytoma cells. In: *Molecular Medicine Reports* 16 (5), S. 6109–6115. DOI: 10.3892/mmr.2017.7368.

- Yudin, Yevgen; Rohacs, Tibor (2012): Regulation of TRPM8 channel activity. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 353 (1-2), S. 68–74. DOI: 10.1016/j.mce.2011.10.023.
- Zelenka, Marek; Schäfers, Maria; Sommer, Claudia (2005): Intraneural injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. In: *Pain* 116 (3), S. 257–263. DOI: 10.1016/j.pain.2005.04.018.
- Zhang, Xuming; Huang, Jiehong; McNaughton, Peter A. (2005): NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. In: *The EMBO Journal* 24 (24), S. 4211–4223.
- Zhang, Xuming; Li, Lin; McNaughton, Peter A. (2008): Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150. In: *Neuron* 59 (3), S. 450–461. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.05.015.
- Zhang, Yan; Kerman, Ilan A.; Laque, Amanda; Nguyen, Phillip; Faouzi, Miro; Louis, Gwendolyn W. et al. (2011): Leptin-receptor-expressing neurons in the dorsomedial hypothalamus and median preoptic area regulate sympathetic brown adipose tissue circuits. In: *The Journal of Neuroscience: The official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (5), S. 1873–1884. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3223-10.2011.
- Zhao, Xiao-Hui; Zhang, Ting; Li, Yun-Qing (2015): The up-regulation of spinal Toll-like receptor 4 in rats with inflammatory pain induced by complete Freund's adjuvant. In: *Brain Research Bulletin* 111, S. 97–103. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2015.01.002.
- Zhou, Ya-Qun; Liu, Zheng; Liu, Zhi-Heng; Chen, Shu-Ping; Li, Man; Shahveranov, Allahverdi et al. (2016): Interleukin-6: an emerging regulator of pathological pain. In: *Journal of Neuroinflammation* 13 (1), S. 141. DOI: 10.1186/s12974-016-0607-6.
- Zuo, Yunxia; Perkins, Nicholas M.; Tracey, David J.; Geczy, Carolyn L. (2003): Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: a key role of mast cells. In: *Pain* 105 (3), S. 467–479. DOI: 10.1016/S0304-3959(03)00261-6.

H. ANHANG

1. Publikationsliste

1.1. Originalarbeiten in Fachzeitschriften (*peer review*)

Leisengang, S.; Ott, D.; Murgott, J.; Gerstberger, R.; Rummel C., Roth, J. (2018) *Primary Cultures from Rat Dorsal Root Ganglia: Responses of Neurons and Glial Cells to Somatosensory or Inflammatory Stimulation*. Neuroscience, 394: 1-13, DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.10.018

Leisengang, S.; Ott, D.; Gerstberger, R.; Rummel C., Roth, J. (2018) *Effects of thermal stimulation on neurons and astrocytes cultured from the rat median preoptic nucleus*. Neuroreport, 29(17): 1468-1472, DOI: 10.1097/WNR.0000000000001134

Leisengang, S.; Ott, D.; Murgott, J.; Nürnberger, F.; Gerstberger, R.; Rummel, C.; Schmidt M.; Roth, J. (2019) *Effects of gabapentinoids on responses of primary cell cultures from rat dorsal root ganglia to inflammatory or somatosensory stimuli. (prepared for publication)*

1.2. Zitierbare Kurzmitteilungen

Leisengang, S.; Ott, D.; Murgott, J.; Gerstberger, R.; Rummel, C.; Roth, J. (2019) *Primary cultures of the rat dorsal root ganglia: influence of lipopolysaccharide and cisplatin on properties of neuronal and glial elements*. Brain, Behavior, and Immunity: in press

Nürnberger F.; Leisengang, S.; Ott, D., Murgott, J.; Gertsberger, R.; Rummel, C.; Roth J. (2019) *Lipopolysaccharide (LPS)-induced tolerance and sensitization: effects on primary cultures of the afferent nociceptive system*. Brain, Behavior, and Immunity: in press

1.3. Beiträge bei wissenschaftlichen Konferenzen

Februar 2017	12th Scientific Meeting of the German Endocrine-Brain-Immune-Network (GEBIN), Münster	Poster: "Responses of cultured dorsal root ganglion neurons to somatosensory and inflammatory stimulation"
Februar 2018	23. Tagung der DVG-Fachgruppe Physiologie und Biochemie, Wien, Österreich	Vortrag: "Primary culture of the rat substantia gelatinosa as a tool to investigate the effects of inflammatory stimulation on the afferent somatosensory system" Poster: "Influence of pre-treatment with cisplatin on the reactivity of primary cell cultures from rat dorsal root ganglia to somatosensory and inflammatory stimuli"
September 2018	11th GGL Conference, Gießen	Vortrag: "Primary culture of the rat dorsal root ganglia: Influence of lipopolysaccharide and cisplatin on properties of neuronal and glial elements" Preis: Best Oral Presentation, 1 st Place, 300€
Oktober 2018	7th International Conference on the Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation (PPTR), Split, Kroatien	Vortrag: "Primary culture of the rat dorsal root ganglia: Influence of lipopolysaccharide and cisplatin on properties of neuronal and glial elements" Poster: "Primary cultures of the rat dorsal root ganglia, the substantia gelatinosa and the median preoptic nucleus: tools to investigate the effects of thermal and neurochemical stimulation" Preis: Poster Communication Award for Young Investigators, Erster Platz, 250€, gesponsort durch die <i>American Physiological Society</i> Reisekostenbeihilfe: <i>Akademie für Tiergesundheit (AfT) & Verein der Freunde und Förderer der Veterinärmedizin (VFFV)</i>

2. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes, allen Freunden und meiner Familie für die stetige Unterstützung im Rahmen meiner Dissertation bedanken.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Joachim Roth bedanken, dessen Bürotür jederzeit offen stand, um für Nachfragen und Probleme sofort Antworten und Lösungen parat zu haben; für die gute Betreuung, die Spontanität bei der ein oder anderen Planänderung, sowie der laufenden Projektplanung in regelmäßigen Meilensteingesprächen.

Bei Prof. Rüdiger Gerstberger möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, diese Doktorarbeit am Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie durchgeführt haben zu dürfen, sowie für die vielen Ratschläge und Hilfestellungen bei Problemen aller Art.

Auch bei Prof. Christoph Rummel möchte ich mich für die Unterstützung bei meiner wissenschaftlichen Arbeit bedanken und dafür, dass er zu jeder Zeit ein offenes Ohr für Fragen hatte.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei unseren technischen Assistentinnen bedanken: Allen voran bei Daniela Ott für die gute Einarbeitung in die Labormethoden, die ständige Unterstützung bei allen Projekten, die Offenheit für neue Ideen und die Ruhe und Gelassenheit auch an schwierigeren Tagen. Auch bei Jolanta Murgott und Doreen Marks möchte ich mich für die Hilfe und Mitarbeit im Rahmen meiner Doktorarbeit ganz herzlich bedanken. Unseren Tierpflegern Michael Haas, Jan Rodrigues-Fonseca und Ralf Matheisl danke ich für die Betreuung unserer Tiere. Bei den Mitarbeitern der Campuswerkstatt Gerd Herber, Alexander Heinrich und Daniel Brandt bedanke ich mich für die Hilfe bei technischen Fragen aller Art. Mein Dank gilt auch Frau Pfeiff-Boschek für die Unterstützung bei sämtlichen Fragen und Problemen bürokratischer Art. Frau Karger danke ich insbesondere für ihre stets positive Ausstrahlung, die Eigenschaft jederzeit mit einem Spruch für Stimmung im Raum zu sorgen und dafür, dass die erste Kanne Kaffee schon bereit steht, wenn die noch schlaftrunkene Arbeiterschaft am Institut erscheint.

Auch bei meinen weiteren Kolleginnen und Kollegen möchte ich mich für die Unterstützung und die schöne Zeit am Institut bedanken. Vor allem danke ich meinem besten Freund und Büronachbar Niklas. Zu Beginn der Doktorarbeit hätten wohl die wenigsten gedacht, dass wir es schaffen, dieses Projekt zu Ende zu bringen, wenn wir so gut wie dauerhaft ein Büro oder Labor teilen dürfen bzw. müssen. Nichtsdestotrotz hätte der Einstieg in das Berufsleben nicht besser sein können. Auch bei Janne, Verena, Sybille, Fabi, Jessica, Alina, Julia, Lena, Jasmin, Mirko, Maanvee und Ervice möchte ich mich für die schöne Zeit im Institut und bei allen Veranstaltungen auch neben der Arbeitszeit, aber natürlich auch für die Unterstützung bei meiner Arbeit bedanken. Unserem Junior-Doktoranden Franz danke ich dabei insbesondere für seine Mitarbeit und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Neben allen Kolleginnen und Kollegen gebührt natürlich ein ganz großer Dank meiner Familie. Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich auf meinem gesamten Weg begleitet und unterstützt haben und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Auch meinen Geschwistern, Neffen und Nichten bin ich für alle Unterstützung unendlich dankbar.

Ausgelassen werden dürfen hier auch keinesfalls alle Freunde, die mich auf meinem bisherigen Weg begleitet haben. Denn ohne einen entsprechenden Freizeitausgleich ist das produktive Arbeiten auch nur halb so schön. Zum einen möchte ich mich hier bei allen Freunden aus meiner Heimat Neuss bedanken. Zum anderen gebührt ein ganz großer Dank auch den *Flamongs*, die die gesamte Zeit während des Studiums und darüber hinaus bis heute unvergesslich gemacht haben. Ich hoffe, dass sich das auch nicht so schnell ändern wird.

3. Erklärung zur Dissertation

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.“

Gießen, den 02.07.2019

Ort, Datum



Unterschrift



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6810-3



9 783835 196810 3